

# BEST AVAILABLE COPY

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2001 年 9 月 27 日 (27.09.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/70817 A1

(51) 国際特許分類: C07K 16/28, C12N 5/16, C12Q 1/06

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/08723

(22) 国際出願日: 2000 年 12 月 7 日 (07.12.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願 2000-77383 2000 年 3 月 21 日 (21.03.2000) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社 医学生物学研究所 (MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD.) [JP/JP]; 〒460-0002 愛知県名古屋市中区丸の内三丁目 5 番 10 号 住友商事丸の内ビル 7 階 Aichi (JP).

(71) 出願人 および

(72) 発明者: 富永 真一 (TOMINAGA, Shin-ichi) [JP/JP]; 〒224-0004 神奈川県横浜市都筑区荏田東 1-3-24 Kanagawa (JP). 新井 孝夫 (ARAI, Takao) [JP/JP]; 〒179-0074 東京都練馬区春日町 5-18-7 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 黒岩 憲二 (KUROIWA, Kenji) [JP/JP]; 〒410-0017 静岡県沼津市高尾台 15-11 Shizuoka (JP). 押川 克久 (OSHIKAWA, Katsuhisa) [JP/JP]; 〒329-0434 栃木県河内郡南河内町祇園 3-1-3 ダイヤパレス自治医大 2-413 Tochigi (JP).

(74) 代理人: 小西 富雅, 外 (KONISHI, Tomimasa et al.); 〒460-0002 愛知県名古屋市中区丸の内二丁目 17 番 12 号 丸の内エステートビル 7 階 Aichi (JP).

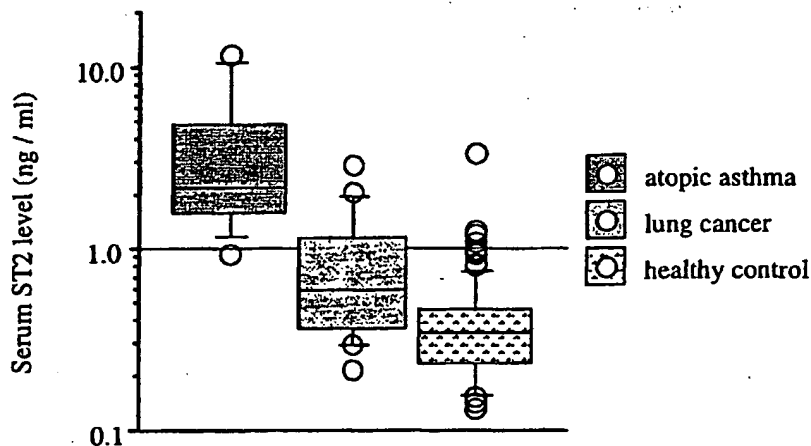
(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL,

[続葉有]

(54) Title: MONOCLONAL ANTIBODY AND METHOD AND KIT FOR THE IMMUNOASSAY OF SOLUBLE HUMAN ST2 WITH THE USE OF THE SAME

(54) 発明の名称: モノクローナル抗体並びにそれを用いる可溶性ヒト ST2 の免疫学的測定方法及び測定キット

Serum ST2 level in patients with lung disease



(57) Abstract: A method and an assay kit for conveniently and highly sensitively assaying soluble human ST2 in a specimen. Soluble human ST2 in a specimen is quantified by an immunological method which involves: a step wherein an immobilized antibody prepared by binding a first antihuman ST2 antibody specifically binding to undenatured human ST2 to an insoluble support is reacted with the specimen; a step wherein the first reaction product formed in the above-described step is reacted with a second antihuman ST2 antibody, which recognizes a site of ST2 different from the site to which the above-described first antihuman ST2

[続葉有]

WO 01/70817 A1



PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ,  
UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

antibody binds and thus binds specifically to undenatured human ST2, labeled with a label to thereby label the first reaction product; and a step wherein the label of the labeled first reaction product is quantified. A calibration curve is formed by using recombinant ST2 as a standard and ST2 in a specimen is quantified based thereon.

(57) 要約:

簡便かつ高感度に検体中の可溶性ヒト ST2 を測定する方法及び測定キットを提供する。

変性していないヒト ST2 に特異的に結合する第1の抗ヒト ST2 抗体を不溶性支持体に結合させた固相化抗体と、検体と、を反応させるステップ、前記のステップにより生じた第1の反応生成物と、前記第1の抗ヒト ST2 抗体が結合する ST2 の部位と異なる部位を認識して変性していないヒト ST2 に特異的に結合する第2の抗ヒト ST2 抗体であって、標識物質により標識された第2の抗ヒト ST2 抗体と、を反応させることにより該第1の反応生成物を標識化するステップ、及び標識化された前記第1の反応生成物の標識量を測定するステップ、とを含む免疫学的方法により検体中の可溶性ヒト ST2 量を測定する。また、標準物質としてリコンビナント ST2 を用いて検量線を作成し、これに基づき検体中の ST2 を定量する。

## 1

## 明 細 書

モノクローナル抗体、並びにそれを用いる可溶性ヒト ST2 の免疫学的測定方法及び測定キット

5

## 技術分野

本発明は、免疫系の疾患に関連するタンパク質であるヒト ST2 に特異的に結合するモノクローナル抗体に関するものである。また、抗ヒト ST2 モノクローナル抗体を用いた可溶性ヒト ST2 の免疫学的測定方法及び測定キットに関するもので

10 ある。

## 背景技術

生体内で免疫反応を調節している細胞としてヘルパーT細胞(Th細胞)が知られている。ヘルパーT細胞は、細胞と細胞の接触による相互作用を通じて、あるいはサイトカインと呼ばれる物質を放出することによって、免疫反応を実行する細胞に働きかけ、これを調節する。

ヘルパーT細胞は、産生するサイトカインの種類によって Th1, Th2 の2種類に大別される。この概念をマウスにおいて始めて提出したのは Mosmann らで、1986年のことであった。彼らは、マウス長期継代細胞 CD4 陽性 T細胞株において、IL-2 や腫瘍壊死因子 TNF- $\beta$ , interferon(IFN)- $\gamma$ などのサイトカインを産生する I 型ヘルパーT(Th1)細胞と、IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 などのサイトカインを産生する II 型ヘルパーT(Th2)細胞に分けることができることを示した。この理論はマウス長期継代細胞株にのみ当てはまるもので、生体内の細胞への応用は難しいと当初考えられた。しかし、その後知見の蓄積によりマウス生体内のヘルパーT細胞にも当てはまる理論であることが判明してきた。

さらにその後の研究により、生体内の多くのヘルパーT細胞には Mosmann の提唱した通りのサブセットに分類できない集団が存在することが判ってきた。とくにこの傾向はマウスよりヒトで顕著であり、両者のサブセットにまたがってサイトカインを産生する細胞が多いことが分かった。そして、両者の混合パターンを呈するヘルパーT細胞亜集団は Th0 細胞と命名された。

Th0 細胞の位置付けとしては、Th1/Th2 に分化する前の前駆体と考えられている。この Th 細胞亜集団は均一ではなく、それぞれの Th0 細胞が産生するサイトカインは量的あるいは質的に異なっている。そこで、Th1 細胞と Th2 細胞の極性から、ヒトにおける Th 細胞の機能はマウスのシステムほど単純ではないと考えられている。マウス等の実験動物から得られた免疫系の知見は蓄積されているものの、これをヒトの疾患の病態にあてはめるには慎重さが必要であり、ヒトの免疫機構に沿った研究が必要とされている。

Th1 細胞はその分泌するサイトカイン(IL-2, TNF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ )の活性によって細胞性免疫を誘導するとされる。ここで、細胞性免疫とは細胞傷害性 T 細胞(CTL)・ナチュラルキラー(NK)細胞・マクロファージなどの細胞を中心とした免疫反応を指す概念であり、これらの細胞が直接標的に作用することを特徴とする免疫反応である。その一例は、マクロファージによる侵入した細菌の貪食・細胞傷害性 T 細胞によるウイルス感染細胞のアポトーシス誘導による除去・NK 細胞によるウイルス感染細胞・腫瘍細胞・移植骨髄細胞の傷害などである。細胞内寄生体・ウイルス・腫瘍に対する免疫反応、移植片に対する免疫反応および臓器特異的自己免疫疾患などはこの免疫反応の関与が大きいとされている。

Th1 細胞の産生するサイトカインである IFN- $\gamma$  は細胞性免疫を実行する細胞の分化増殖や活性化を促すことにより、生体のとる免疫反応を細胞性免疫(以下、「Th1 型免疫反応」という)に向ける。また、後述する Th2 細胞の産生するサイトカインは、Th1 型免疫反応を抑制することが知られている。

Th1 細胞とは逆に、Th2 細胞はその分泌するサイトカイン(IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13)の活性によって液性免疫およびアレルギー反応などの免疫反応を誘導するとされる。これらの免疫反応に主に関与する細胞は B 細胞と好酸球・マスト細胞などである。

- 5      ここで、液性免疫とは血清の注入によって他の個体に移すことのできる免疫反応ということを示す概念であり、抗体、即ち、IgG や IgM を中心とした免疫反応を指している。IgG や IgM は細胞などによる毒素の中和・微生物の凝集やオプソニン化に関与し、マクロファージによるそれらの除去を助ける活性がある。

一方、I 型アレルギー反応を媒介する抗体である IgE は Th2 の働きにより分泌  
10      が促進される。IgE はマスト細胞表面の IgE 受容体(FcεRI)に結合し、抗原特異的な FcεRI の架橋を引き金としてマスト細胞から各種メディエーター（ヒスタミン・プロテアーゼ・ヘパリン等）の放出をすることにより抗原 I 型アレルギー反応を引き起こす。

Th2 細胞の産生するサイトカインは液性免疫あるいはアレルギー反応に関与す  
15      る細胞の分化増殖や活性化を促すことにより、生体をとる免疫反応をこれらの「抗体を介した」免疫反応（以下、「Th2 型免疫反応」という）へと向ける。Th1 細胞は、その産生するサイトカイン(主として IFN-γ)により、Th2 型免疫反応を抑制することが知られている。

上述の Th1 細胞と Th2 細胞の活性化のバランス、あるいは細胞数のバランス  
20      が、生体をとる免疫反応が Th1 型優位であるか、Th2 型優位であるかを決定すると考えられている。また、このバランスが免疫系における病態をも決定すると考えられ始めている。

それを示す実験結果として、各種実験用マウスの遺伝的背景の違いにより、同じ感染源であっても種によって免疫反応が Th1 型あるいは Th2 型にわかれるこ  
25      とがあり、また、このとき感染の予後も変化することが挙げられる。

例えば、寄生虫感染症の一種であるリーシュマニア症に対して、Th1 型の免疫応答をする C57BL/6 マウスでは感染に抵抗性であるのに対して、Th2 型の免疫応答をする Balb/c マウスでは易感染性であった (Heinzel, F.P., Sadick, M.D., Holandy, B.J., et al.: J. Exp. Med. 169:59, 1989)。これは、細胞  
5 内部の感染には、寄生された細胞ごと寄生物を破壊して除去する Th1 型免疫反応が感染防御に有利に働く結果と考えられる。

さらに、C57BL/6 マウスに対して IL-4, IL-10, 抗 IFN- $\gamma$  中和抗体を投与して Th2 型免疫応答に誘導すると易感染性になるのに対して、Balb/c マウスに対して IFN- $\gamma$ , 抗 IL-4 中和抗体、抗 IL-10 中和抗体を投与し Th1 型免疫応答に誘  
10 導すると抵抗性となった。この結果から各マウスの遺伝的背景より、免疫応答の型が病態により大きな影響を持つことが示された。また、リステリア症やブルセラ症などの細胞内寄生病原菌においても Th1 型の免疫応答において感染防御が行われることが報告されている (Araya LN, Elzer PH, Rowe GE, Enright FM, Winter AJ, J. Immunol. 143:10 3330-7, 1989)。

15 実際の免疫系においては、Th1 と Th2 のバランスを感染の時間経過に従って巧みにコントロールすることで生体防御を行なっていることが明らかになってきつつある。

これらから類推して、サイトカインあるいは抗サイトカイン抗体などの投与で生体内の Th1/Th2 バランスを制御することが有効な免疫系の異常による疾患の  
20 治療手段になると期待されている。

Th1 と Th2 とは、その産生するサイトカインの差によって分類されたものであるが、各細胞表面の分子 (表面マーカー) の相違も研究されてきている。かかる相違を見つけることができれば、それを基にそれぞれの細胞を分離するなどして、詳細な解析を行うことが可能である。特に Th1 あるいは Th2 に特異的に分化・  
25 増殖あるいは活性化の刺激を伝える表面分子が明らかになれば、それが直接の治

療の対象になり得る。

しかし、現在までのところ、生体内の Th1 と Th2 を容易に識別できる表面マーカーはまだ確立していないが、この数年、Th1, Th2 の表面マーカーに関する報告は急増している。表面マーカーの有望な候補として、Th2 表面上に特異的に  
5 発現しているタンパク分子が発見され、ST2L と命名された (Yanagisawa,K.,et al.: FEBS Lett. 318:83,1993、及び Yanagisawa,K.,et al.: J. Biochem. 121:95,1997)。

ST2L は ST2 遺伝子発現産物の一つである。ST2 遺伝子発現産物は、以下の 3 つのタイプから構成されており、各タイプは選択的スプライシングによって生じ  
10 ると考えられている。ST2 遺伝子産物の第 1 のタイプは可溶性分泌型で、ST2 と標記される。この遺伝子が 3 つのタイプの中でもっとも早く発見された。ST2 は、  
T1、Fit-1、又は DER4 と呼ばれ、細胞増殖において準早期(delayed-early)血清反応遺伝子群に分類される。即ち、ST2 は G0 期の Balb/c 3T3 細胞において発  
現しておらず、細胞が血清によって増殖刺激を受け、細胞周期の G0 期から G1  
15 期あるいは S 期に入ったときに血清添加後 10 時間後をピークとして高度に発現  
される。このタンパク質は本研究者らによって発見され、本研究者らはヒトの ST2  
をコードする遺伝子の解析を行っている(特開平 6-178687 号公報参照)。

第 2 のタイプは膜貫通受容体型の ST2L である。ST2L は、アミノ酸配列でインターロイキン 1 (Interleukin-1, IL-1: 炎症反応等に関与する分子として知ら  
20 れる)受容体に対して非常に高い相同性があり、特に細胞内部分の方がより相同性  
が高い。IL-1 受容体に相同性の高い分子としては他に IL-18 受容体があり、これらは IL-1 受容体ファミリーを構成する。

IL-1 受容体は AcP というタンパク質とともに、IL-18 受容体は AcPL というタンパク質とともにそれぞれ高親和性受容体を形成することが判明している。ST2L  
25 も、AcP 等に類似するタンパク質と共に高親和性受容体を形成することが示唆さ

れる。

ST2L と IL-1 受容体のリガンドの結合に関しては IL-1  $\alpha$ ,  $\beta$ , receptor antagonist のいずれとも結合しないことがわかっており、IL-1 のシグナル伝達系への関与は明らかになっていない。

- 5      ST2L に対する特異的なリガンドに関しては、結合タンパク質の精製、クローニングの報告があるが、クローニングされたものはシグナルを惹起できない単なる結合タンパク質であるらしく、生理的なリガンドが他にある可能性が示唆される。

- 10      尚、ST2 の第 3 番目のタイプは第 1 のタイプの異性型 (variant form) で ST2V と標記される。

本研究者らは、先の研究において、造血系の培養細胞を用いた RT-PCR による解析を行い、ST2 の発現を調べてみた。その結果、リンパ球以外ではほとんどの細胞に ST2 遺伝子が発現していた。

- 15      次にリンパ球系では、B 細胞系の細胞には発現が見られず、T 細胞系に ST2 遺伝子を発現する細胞が見出された。

- さらに、T 細胞系の中で詳しく調べるために、ノーザンブロッティング法を用いてマウスの T 細胞系において ST2 と ST2L の発現を調べてみた。すると Th1 細胞では ST2 の発現はフォルボールエステル (PMA) と A23187 による同時刺激後も見られないが、Th2 細胞においては未刺激の状態でも ST2L の mRNA 発現が  
20      認められた。さらに刺激によって、ST2 の mRNA の発現が誘導された。

- 更に、Th1 型にも Th2 型にも分化できるマウスの培養細胞である EL-4 を用いて実験を行ったところ、EL-4 を PMA 単独で刺激すると Th1 型のサイトカインである IL-2 や IFN- $\gamma$  を産生し、PMA とジブチリル cAMP で同時刺激すると Th2 型のサイトカインの IL-4, IL-5 等を産生するようになる。このとき、刺激なし  
25      では ST2 の発現は見られないが、PMA とジブチリル cAMP で同時刺激を行なっ



たときのみ ST2, ST2L 双方の mRNA が強く発現誘導された。このことより、この実験モデルにおいて、ST2 の発現は Th2 型のサイトカインの発現と同じ挙動をとっていることがわかる。

5      他のグループも、マウスにおいて ST2L タンパク質が Th2 細胞に構成的に発現されており、他の細胞傷害性 T 細胞等にはないことと、フローサイトメトリーを用いた解析で、ST2L タンパク質が Th2 サブセットのマーカーとして利用できることを報告している (Yanagisawa, K., Naito, Y., Kuroiwa, K., et al.: J. Biochem., 121:95, 1997)。

ST2 について、Xu らは in vitro で ST2 に対する抗体が Th2 亜集団に対して  
10   細胞死を誘導することを見出した (Xu D, et al.: J. Exp. Med. 787-794:187, 1998)。この抗体を用いた in vivo の実験では、この抗体は Balb/c マウスのリシユマニア症に対する易感染性を抑制することが示された。前述したように Balb/c はリシユマニア症において Th2 型免疫応答をとるために易感染性であるが、抗 ST2 抗体による Th2 細胞の除去によって Th1 型の免疫応答が  
15   誘導されたと考えられる。さらにこの抗体は Th1 型免疫反応が優位の状態で起こるとされるコラーゲン誘導性の関節炎を DBA-1 マウスにおいて悪化させた。これらの結果は、この抗 ST2 抗体が Th2 を抑制した結果、Th1 型の免疫反応を誘導できたことを示している。ただし、この抗体の生理的な機能については明確に判明していない。

20   さらに、抗 ST2 抗体若しくは ST2 を投与することによりアレルギー性気道炎症を惹起したモデルマウスの気管支洗浄液中の好酸球数や組織染色による Th2 数、IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 といった Th2 型のサイトカインの分泌量が低下したと報告されている (Löhning M, et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 6930-6935:95, 1998, Xu D, et al.: J. Exp. Med. 787-794:187, 1998)。  
25   これらの報告により、分泌型の ST2 が本来細胞表面の ST2L に結合するはずであ

った生理的なりガンドと競合することにより ST2L を介するシグナルを阻害している可能性が示唆される。

以上の実験から、ST2L が Th1/Th2 のバランスだけではなく、積極的に Th2 の機能に関与している可能性が示唆される。

- 5 分泌型の ST2 は膜貫通型である ST2L の細胞外部分に相当するものと考えられる。上述のように、両者は選択的スプライシングにより生じると考えられている。

Th2 細胞では、ST2L は恒常的に発現されているが ST2 の発現は抗原刺激依存性であることは分かっているものの、現時点では ST2 の生理的機能は不明である。しかし、上述のように、ST2 の投与又は ST2L に対する中和抗体の投与がマウス  
10 モデルにおいてアレルギー性疾患、即ち Th2 型免疫反応を抑制することから、血中において分泌型の ST2 と膜貫通型である ST2L は生理的リガンドの結合において競合し、ST2L によって細胞内に伝えられている Th2 型免疫反応を惹起するシグナルを ST2 は抑制しているモデルが考えられる。

このように、分泌型の ST2 は免疫系におけるシグナル伝達に関与していること  
15 が示唆され、生体における ST2 量は、免疫系の状態を表す新規な指標となることが考えられる。しかしながら、現状においては、分泌型の ST2 に関する生物学的知見が十分に得られていない。また、Th1/Th2 に関する研究の大半はマウス等の実験動物を対象に行われてきており、そこで得られた知見をヒトに応用する場合には、ヒト ST2 について特有の機能を解明する必要がある。

20 ヒト ST2 に関する生物学的知見を蓄積し、その生体内における機能を解明するためには、生体内における状態、即ち変性していないヒト ST2 を迅速かつ簡便に測定する方法の開発が望まれる。かかる測定方法として、ヒト ST2 に対するモノクローナル抗体を利用した E L I S A 法等の免疫学的方法が有効であると考えられる。

25 ヒト ST2 に対するモノクローナル抗体に関しては、本研究者らのグループによ

ってその作製が試みられており、数種類の抗ヒト ST2 モノクローナル抗体が得られている (Yoshida K, et al.:Hybridoma 419-427:14,1995)。しかしながら、それらの抗体は、ヒト ST2 遺伝子が大腸菌において発現して得られたヒト ST2 タンパクを免疫源として使用した結果得られたものであり、変性されたヒト ST2 5 に対しては特異的に結合するものの、変性していないヒト ST2 を特異的に認識することはできないものであった。そのため、生体試料中における変性していないヒト ST2 を測定するための E L I S A 法等に利用することはできないものであった。

一方、Werenskiold らは、ヒト ST2 の測定方法として mRNA を検出する PCR 10 法あるいは免疫組織染色による方法を開示するが (WO98/430990 参照)、かかる方法は定性的ないしは半定量的なものであり、即ち定量的にヒト ST2 を測定することを目的としたものではなかった。

本発明は、以上の課題を鑑みなされたものであり、変性していないヒト ST2 に 15 特異的に結合するモノクローナル抗体を提供することを目的とする。また、かかるモノクローナル抗体を用いた、生体試料中の変性していない可溶性 (分泌型) ヒト ST2 を迅速かつ簡便に測定する方法を提供することを目的とする。さらに、可溶性ヒト ST2 の測定方法により、アレルギー疾患等の免疫系の異常の検出、診断、研究、経過観察、予後予測等への有効な手段を提供することをも目的とする。

## 20 発明の開示

本発明者らは、上記目的を達成すべく、ヒト ST2 (hST2) に特異的に結合する抗体を用いた免疫学的測定法に注目して鋭意研究を行った結果、変性していないヒト ST2 を認識するモノクローナル抗体を得ることに成功し、本発明を完成するに至った。即ち、本発明は、変性していないヒト ST2 に特異的に結合するモノク 25 ローナル抗体である。変性していないヒト ST2 とは、SDS 等のタンパク変性剤等

により変性されていない状態のヒト ST2 をいい、例えば、ヒト生体内におけるネイティブの状態のヒト ST2 である。また、ヒト ST2cDNA を用いて調製したリコンビナントヒト ST2 であって、変性していない状態のものも含まれる。

このモノクローナル抗体には、変性していない可溶性（分泌型）ヒト ST2 に特異的に結合するもの、及び変性していない膜結合型ヒト ST2（ヒト ST2L）に特異的に結合するものが含まれる。また、このモノクローナル抗体には、受託番号が FERM P-17780、FERM P-17781、又は FERM P-17782 であるハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体が含まれる。

また、本発明は前記モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ自体である。即ち、変性していないヒト ST2 に特異的に結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマであり、受託番号が FERM P-17780 のハイブリドーマ、受託番号が FERM P-17781 のハイブリドーマ、及び受託番号が FERM P-17782 のハイブリドーマが含まれる。

更に、本発明は、上記のモノクローナル抗体を用いて検体中の可溶性ヒト ST2 を免疫学的に測定する測定方法である。かかる測定方法には、変性していないヒト ST2 に特異的に結合するモノクローナル抗体を2種類用いた測定方法が含まれる。

更に、本発明は変性していないヒト ST2 に特異的に結合する抗体を含む、可溶性ヒト ST2 の免疫学的測定キットである。

20

#### 図面の簡単な説明

第1図は、イムノプロットティングの結果を示す図である。レーン1～3には、実施例1における抗原を免疫されたマウスの血清についての測定結果が示される。また、レーン4～6には、実施例2におけるモノクローナル抗体 2A5、FB9 及び HB12 についての測定結果が示される。矢印は hST2 位置を示す。

25

第2図は、実施例2の免疫沈降アッセイの結果を示す図である。矢印と矢じりはそれぞれ糖鎖の付加を受けた約80kDaのhST2L及び糖鎖の付加されていない約60kDaのhST2Lの位置を示す。

第3図は、実施例3のcell ELISA法の結果のグラフである。

5 第4図は、実施例3の競合ELISA法の結果を示すグラフである。

第5図は、実施例4のフローサイトメトリーの結果を示すグラフである。

第6図は、実施例7のサンドイッチELISA法の定量に用いられる、標準物質としてのrhST2を用いて作成したスタンダードカーブである。

第7図は、実施例7における、検体中の可溶性hST2を測定した結果を各疾患  
10 別のグループ毎にプロットしたグラフを表したものである。

第8図は、実施例7の測定に用いた各疾患又は健常者の例数、平均値、標準偏  
差及び標準誤差を示した表である。

本発明を実施するための最良の形態

15 本発明のモノクローナル抗体は次のように製造することができる。まず、変性していないヒトST2に特異的に結合する抗体の作製に適した抗原を調製し、これをマウス等に免疫する。その後、免疫された動物から抗体産性細胞を摘出し、これと骨髓腫細胞とを融合してハイブリドーマ細胞を得る。続いて、このハイブリドーマをモノクローナル化した後、ヒトST2に高い特異性を有する抗体を産生す  
20 るクローンを選択する。最後に、選択されたクローンが産生するモノクローナル抗体が変性していないヒトST2を認識可能かどうかを確認する。

抗原としては、ヒトST2が用いられる。ヒトST2は、生体試料を精製することにより得ることができる。また、組換えヒトST2を用いることもできる。組換えヒトST2の調製方法としては、例えば、ヒトST2をコードする遺伝子をベクター  
25 を用いて酵母等の真核細胞に導入し、組換え細胞内で発現させることにより取得

される。好ましくは、宿主細胞として COS 7 細胞等の哺乳動物細胞を用いる。変性していないヒト ST2 により近い状態のタンパクを得るためである。一般に、哺乳動物細胞の産生する組換えタンパクは、酵母等の産生するものに比較してヒト生体内の状態に近いものと考えられるため、哺乳動物細胞を用いた組換えヒト

5 ST2 タンパクを抗原とすれば、ヒト生体内における変性していない ST2 に対する特異性の高い抗体が取得できると考えられるからである。

ベクターとしては、ST2 遺伝子を宿主細胞に組み込むことができ、宿主細胞内で目的の遺伝子を発現できるものであれば特に限定されず、宿主細胞との関係で適宜選択される。

10 また、膜貫通型であるヒト ST2L を細胞表面に発現した細胞を細胞ごと抗原として用いることもできる。ここで、ヒト ST2L の細胞外部分は分泌型のヒト ST2 に相当する。そのため、かかる細胞を抗原とすれば、ヒト ST2L の細胞外部分、即ち、ヒト ST2 に相当する部分をエピトープとする抗体を取得することができる。例えば、ヒト ST2L をコードする cDNA を組み込んだベクターを宿主細胞にトランスフ

15 エクトすることにより、細胞表面に ST2L を発現する細胞を得ることができる。また、ヒト ST2L の細胞外部分とマウス ST2L の膜貫通部分及び細胞内部分をコードする遺伝子を組み込んだベクターを用いて宿主細胞をトランスフェクションすることにより、キメラ ST2L 分子を細胞表面に発現する細胞を取得することもできる。

異なるエピトープを認識する抗体を複数取得するためには、異なる抗原をそれ

20 ぞれ用いて免疫することが望ましい。

免疫方法としては、例えば、上記抗原をフロインド完全あるいは不完全アジュバンドと混合してエマルジョン化し、マウス等の腹腔内、皮下又は筋肉に一定の間隔をおいて数回注射する。免疫する動物としては、マウスの他、ラット、ハムスター、ウサギ、モルモット、ニワトリ、ヒツジ、ヤギ等を用いることができる。

25 免疫が完成した後、免疫した動物の脾臓を採りだし、抗体産生細胞を取得する。

抗体産生細胞は、リンパ節、末梢血液などから採取することもできる。

骨髄腫細胞の種類は特に限定されず、免疫に用いる動物との関係で適宜選択される。即ち、抗体産生細胞と同種の動物由来の骨髄腫細胞を用いることが好ましく、例えば、マウスを用いた場合にはミエローマ細胞株 PAI を用いることができる。細胞融合は、例えば一定割合で抗体産生細胞と骨髄腫細胞を混合し、ここへ  
5 ポリエチレングリコールを加えて攪拌処理することにより行われる。また、電気パルスを用いて細胞融合をすることもできる。

細胞融合が行われたハイブリドーマのみを選択するには、一般的な HAT 培地（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジンを所定の割合で含有した選択培地）を用いた方法を用いることができる。ハイブリドーマを含む培養液は後の選択のため  
10 96well plate 等の容器内で生育される。

次に、各容器内の培養上清を採取し、ヒト ST2 に対する抗体を産生しているハイブリドーマをヒト ST2 を用いた ELISA 法等により選択する。抗体陽性の容器内のハイブリドーマは限界希釈法によりクローニングし、モノクローナル化された  
15 ハイブリドーマ細胞株が得られる。

抗ヒト ST2 モノクローナル抗体は、ハイブリドーマの培養液を精製することにより取得することができる。また、ハイブリドーマを所望数以上に増殖させた後、これを動物（例えばマウス）の腹腔内に移植し、腹水内で増殖させて腹水を精製することにより取得することもできる。上記培養液の精製又は腹水の精製には、  
20 プロテイン G、プロテイン A 等を用いたアフィニティークロマトグラフィーが好適に用いられる。また、抗原を固相化したアフィニティークロマトグラフィーを用いることもできる。更には、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、硫酸分画、及び遠心分離等の方法を用いることもできる。これらの方法は単独ないし任意に組み合わせられて用いられる。

25 以上の方法により得られた抗ヒト ST2 モノクローナル抗体が変性していないヒ

ト ST2 を特異的に認識するか否かは、例えば、ヒト ST2L を細胞表面に発現している細胞を用いた cell ELISA 法により確認することができる。かかる方法では、細胞が固定されることなく用いられるため、その表面に発現されたヒト ST2L は変性していない状態である。ここで、ヒト ST2L の細胞外部分は上述のようにヒト  
5 ST2 に相当するため、かかる細胞を用いた cell ELISA 法によれば、変性していないヒト ST2 と各モノクローナル抗体との反応性が確認されることとなる。

以上のようにして得られた、変性していないヒト ST2 に特異的に結合する抗ヒト ST2 モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマとしては、以下の国際寄託機関に寄託された受託番号 FERM P-17780、FERM P-1778  
10 1、及び FERM P-17782 のものが挙げられる。

#### 国際寄託機関

名称：通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

住所：日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号（郵便番号 305-0046）

寄託日：2000 年 3 月 15 日

15 上記の方法により調製したモノクローナル抗体を用いて可溶性ヒト ST2 を免疫学的に測定することができる。測定方法としては、例えば、ELISA 法、ラジオイムノアッセイ、FACS、免疫沈降法、イムノプロットティング等の定性的又は定量的な方法が挙げられる。好適な測定方法としては、例えば以下の方法である。即ち、  
a) 変性していないヒト ST2 に特異的に結合する第 1 の抗ヒト ST2 抗体を不溶性  
20 支持体に結合させた固相化抗体と、検体と、を反応させるステップ、b) 前記 a) のステップにより生じた第 1 の反応生成物と、前記第 1 の抗ヒト ST2 抗体が結合する ST2 の部位と異なる部位を認識して変性していないヒト ST2 に特異的に結合する第 2 の抗ヒト ST2 抗体であって、標識物質により標識された第 2 の抗ヒト ST2 抗体と、を反応させることにより該第 1 の反応生成物を標識化するステップ、及  
25 び c) 標識化された前記第 1 の反応生成物の標識量を測定するステップを含む、



可溶性ヒト ST2 の免疫学的測定方法である。

上記測定方法は、次のステップをさらに含むことができる。即ち、d) 前記固相化抗体と、標準物質としての可溶性ヒト ST2 と、を反応させるステップ、e) 前記 d) のステップにより生じた第 2 の反応生成物と、前記標識物質により標識された第 2 の抗ヒト ST2 抗体と、を反応させることにより該第 2 の反応生成物を標識化するステップ、f) 標識化された前記第 2 の反応生成物の標識量を測定する、ことにより検量線を作成するステップ、及び g) 前記第 1 の反応生成物の標識量と前記検量線とから前記検体中の可溶性ヒト ST2 を定量するステップである。

かかる d) ~ g) のステップでは標準物質としての可溶性ヒト ST2 を用いて検量線が作成される。そして、この検量線に基づいて第 1 の反応生成物の標識量が定量され、その結果、検体中の可溶性 ST2 が定量される。

上記において、第 1 の抗ヒト ST2 抗体又は第 2 の抗ヒト ST2 抗体には、上述の方法により調製される変性していないヒト ST2 に特異的に結合するモノクローナル抗体が好適に用いられる。モノクローナル抗体の特異性の高さにより、高感度の測定が可能となる。第 1 の抗ヒト ST2 抗体又は第 2 の抗ヒト ST2 抗体として、複数種類のモノクローナル抗体を組み合わせて用いることもできる。好ましくは、受託番号が FERM P-17780、FERM P-17781、及び FERM P-17782 のハイブリドーマの群から任意に選択される 1 又は 2 種以上のハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体を用いる。

さらには、第 1 の抗ヒト ST2 抗体及び第 2 の抗ヒト ST2 抗体として、上述の方法により調製される、異なるエピトープを認識する 2 種類の抗ヒト ST2 モノクローナル抗体を用いることが好ましい。特異性の高いモノクローナル抗体を 2 種類組み合わせて用いることにより、より高感度の測定が可能となるからである。

各抗ヒト ST2 モノクローナル抗体のエピトープの検討は、ヒト ST2 を用いた競合 ELISA 法により行うことができる。即ち、2 種類の抗ヒト ST2 モノクローナル

抗体を同時にヒト ST2 と反応させ、両者の競合をみる。その結果、競合しない 2 種類の抗ヒト ST2 モノクローナル抗体を、エピトープの異なるモノクローナル抗体の組合せとして選択することができる。

第 1 の抗ヒト ST2 抗体として、受託番号が FERM P-17780、FERM P-17781、及び FERM P-17782 のハイブリドーマの群から任意に選択される 1 又は 2 種のハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体を用い、第 2 の抗ヒト ST2 抗体として、第 1 の抗体用のハイブリドーマとして選択されなかった 1 又は 2 種のハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体を用いることができる。さらに好ましくは、第 1 の抗ヒト ST2 モノクローナル抗体として、受託番号 FERM P-17780、又は FERM P-17782 のハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体を用い、第 2 の抗ヒト ST2 抗体として、受託番号 FERM P-17781 のハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体を用いる。

尚、第 1 の抗ヒト ST2 抗体及び第 2 の抗ヒト ST2 抗体の片方又は両者をポリクローナル抗体とすることもできる。

前記標準物質としての可溶性ヒト ST2 には、リコンビナントヒト ST2（以下、「rhST2」という）を用いることが好ましい。rhST2 は大量且つ均質に製造できる点で好ましい。rhST2 としては、ヒト ST2 と GST、 $\beta$  ガラクトシダーゼ、マルトース結合タンパク、又はヒスチジン (His) タグ等との融合タンパクとして発現されたものを用いることができる。これらの融合タンパクは、汎用的な方法により簡単に精製することができる。

固相化抗体に用いる不溶性支持体としては、例えばポリスチレン樹脂、ポリカーボネート樹脂、シリコン樹脂、ナイロン樹脂等の樹脂や、ガラス等の水に不溶性の物質が用いられ、特にその材質は限定されない。この不溶性支持体への第 1 の抗 ST2 抗体の担持は物理吸着又は化学吸着によって行われる。

標識物質には、ペルオキシシダーゼ、 $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ、マイクロペルオキシダーゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP)、フルオレセインイソチオシアネート (FITC)、ローダミンイソチオシアネート (RITC)、アルカリホスファターゼ、ビオチン、及び放射性物質の中から任意に選択されるものが好適に用いられる。特に、ビオチンを標識物質として用い、アビジンペルオキシダーゼを反応させる方法によれば、より高感度の測定が可能である。

検体としては、血清、血漿、尿、髄液、腹水、胸水等の生体液が用いられる。好ましくは、血清が用いられる。血清を用いれば、簡便な測定が可能である。

上述の方法により取得した変性していないヒト ST2 に特異的に結合するモノクローナル抗体を用いて可溶性ヒト ST2 の免疫学的測定用キットを構成することができる。好ましくは、受託番号 FERM P-17780、FERM P-17781、及び FERM P-17782 であるハイブリドーマの群から任意に選択される 1 又は 2 以上のハイブリドーマにより産生される 1 又は 2 以上のモノクローナル抗体を用いて、当該キットを構成する。

15 さらには、以下の構成品を含むキットとすることができる。即ち、変性していないヒト ST2 に特異的に結合する第 1 の抗ヒト ST2 抗体と、前記第 1 の抗ヒト ST2 が結合する部位と異なる部位を認識して変性していない ST2 に特異的に結合する第 2 の抗ヒト ST2 抗体であって、標識物質により標識された第 2 の抗ヒト ST2 抗体と、及び標準物質としての可溶性ヒト ST2 である。ここで、第 1 の抗ヒト ST2 抗体を不溶性支持体に結合した固相化抗体としてもよい。

第 1 の抗ヒト ST2 抗体又は第 2 の抗ヒト ST2 抗体には、上述の方法により調製される変性していないヒト ST2 に特異的に結合するモノクローナル抗体が好適に用いられる。モノクローナル抗体の特異性の高さにより、高感度の測定が可能となる。第 1 の抗ヒト ST2 抗体又は第 2 の抗ヒト ST2 抗体として、複数種類のモノクローナル抗体を組み合わせることもできる。好ましくは、受託番号が

FERM P-17780、FERM P-17781、及びFERM P-17782のハイブリドーマの群から任意に選択される1又は2種以上のハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体を用いる。第1の抗ヒトST2抗体又は第2の抗ヒトST2抗体として複数種類のモノクローナル抗体を組み合わせることもできる。

さらには、第1の抗ヒトST2抗体及び第2の抗ヒトST2抗体として、上記の方法により調製される、異なるエピトープを認識する2種類の抗ヒトST2モノクローナル抗体を用いることが好ましい。特異性の高いモノクローナル抗体を2種類組み合わせるにより、より高感度の測定が可能となるからである。この場合において、第1の抗ヒトST2抗体として、受託番号がFERM P-17780、FERM P-17781、及びFERM P-17782のハイブリドーマの群から任意に選択される1又は2種のハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体を用い、第2の抗ヒトST2抗体として、第1の抗体用のハイブリドーマとして選択されなかった1又は2種のハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体を用いることが好ましい。さらに好ましくは、第1の抗ヒトST2モノクローナル抗体として、受託番号FERM P-17780、又はFERM P-17782のハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体を用い、第2の抗ヒトST2抗体として、受託番号FERM P-17781のハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体を用いる。

尚、第1の抗ヒトST2抗体及び第2の抗ヒトST2抗体の片方又は両者をポリクローナル抗体とすることもできる。

前記標準物質としての可溶性ヒトST2には、rhST2を用いることが好ましい。rhST2は大量且つ均質に製造できる点で好ましい。rhST2としては、ヒトST2とGST、 $\beta$ ガラクトシダーゼ、マルトース結合タンパク、又はヒスチジン(His)タグ等との融合タンパクとして発現されたものを用いることができる。これらの融

合タンパクは、汎用的な方法により簡便に精製することができる。

固相化抗体に用いる不溶性支持体としては、例えばポリスチレン樹脂、ポリカーボネート樹脂、シリコン樹脂、ナイロン樹脂等の樹脂や、ガラス等の水に不溶性の物質が用いられ、特にその材質は限定されない。この不溶性支持体への第 15 の抗 ST2 抗体の担持は物理吸着又は化学吸着によって行われる。

標識物質には、ペルオキシダーゼ、 $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ、マイクロペルオキシダーゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP)、フルオレセインイソチオシアネート (FITC)、ローダミンイソチオシアネート (RITC)、アルカリホスファターゼ、ビオチン、及び放射性物質の中から任意に選択されるものが好適に用いられる。特に、ビオチンを標識物質として用い、アビジンペルオキシダーゼを反応させる方法によれば、より高感度の測定が可能である。

上記のモノクローナル抗体を用いて細胞表面に発現される膜結合型ヒト ST2L を免疫学的に測定することができる。測定方法としては、ヒト ST2L を発現している細胞よりヒト ST2L を抽出、精製等した後に測定する方法の他、生細胞表面に発現しているヒト ST2L を直接測定することも可能である。後者の方法として、例えば、cell-ELISA 法が挙げられる。また、ELISA 法、ラジオイムノアッセイ、FACS、免疫沈降法、イムノブロットリング等の方法により、ヒト ST2L の測定をすることもできる。

ヒト ST2L を測定することにより、例えば、検体中の Th 1 細胞と Th 2 細胞の比率を測定できる。その結果、両細胞のバランスに起因する疾患の診断等の有効な手段を提供できる。また、免疫系のメカニズム解明のための有効な手段となり得る。

〔実施例 1〕 変性していないヒト ST2 に特異的に結合するモノクローナル抗体の作製

#### 25 (1-1) 抗原の調製

変性していないヒト ST2 (以下、「hST2」という) に特異的に結合するモノクローナル抗体を得るために 2 つの異なる抗原を用いた。第 1 の抗原は、hST2 遺伝子を導入した COS7 細胞において生産され、分泌される可溶性組換え hST2 である。第 2 の抗原は、その細胞外部分がヒト ST2L (以下、「hST2L」という) に相当し、膜貫通部分や細胞内部分はマウス ST2L に相当するキメラ分子 HMS を発現する COS7 細胞である。以下、各抗原の調製方法を説明する。

a. 可溶性組換え hST2 (rhST2) の調製

ヒト全長 ST2 cDNA (配列番号 1) のすべてのコーディング領域を含む発現ベクター (pEF-BOS-ST2H) を構築し、COS7 細胞にトランスフェクトした (Tominaga S, et al.: Biochim. Biophys. Acta. 215-218:1171, 1992, 及び Yoshida K, et al.: Hybridoma, 419-427:14, 1995 に記載の方法に従って行った)。その後、トランスフェクトされた COS7 細胞の培養上清から、ヘパリンアガロースカラムと MonoQ HR5/5 カラム (アマシャムファルマシアバイオテク社) を用いて rhST2 を精製した (Yanagisawa K, et al.: J. Biochem. 95-103: 121, 1997 に記載の方法に従って行った)。rhST2 の最終精製物は SDS-PAGE の銀染色法において単一バンドを示した。このタンパク質の濃度は BSA を標準としてブラッドフォード法を用いて決定された。

b. キメラ分子 HMS を発現する COS7 細胞の調製

他の抗原として、細胞外部分が hST2L に相当し、膜貫通部分や細胞内部分はマウス ST2L に相当するキメラ分子 HMS を発現する COS7 細胞を次の方法により調製した。即ち、ヒト ST2L の細胞外部分とマウス ST2L の膜貫通部分及び細胞内部分を含む HMS キメラ分子を産生する pEF-BOS-HMS を COS7 細胞に導入した。HMS キメラ分子及び pEF-BOS-HMS の製造法は吉田らの方法 (Yoshida K, et al.: Hybridoma 419-427:14, 1995) に従って行った。pEF-BOS-HMS の COS7 細胞への導入には、まず、等張のトリス緩衝液、20mM Tris-HCl (pH 7.5

at 20℃)、120mM NaCl、で COS7 細胞を洗浄した後、DEAE-デキストラン溶液と混合した pEF-BOS-HMS を加え、室温で 15 分保温した。次に、等張のトリス緩衝液で洗浄した後、トランスフェクトされた COS7 細胞を 20%(w/v)グリセロールを含む等張のトリス緩衝液で 2 分間室温において処理した。その後、150  
5  $\mu$ M クロロキンを含む DME+10%FBS で 3 時間、5% CO<sub>2</sub>, 37℃ の環境下で処理した。以上の処理の後、培地を DME+10%FBS に交換し、5% CO<sub>2</sub>, 37℃ で培養を行った。培養 48 時間後の細胞を PBS に懸濁し、後述の免疫に用いる抗原溶液とした。

#### (1-2) 抗体産生細胞の調製

##### 10 a. rhST2 を抗原とした抗体産生細胞の調製

上記の方法により調製した 50  $\mu$ g の rhST2 をフロインド完全アジュバントと混合してエマルジョン化し、Balb/c マウス（6 週令、メス）に皮下注射した。2 度目の免疫として、最初の免疫から 2 週目に 25  $\mu$ g の rhST2 をフロインド不完全ア  
15 ジュバントと混合した後、上記同様に皮下注射した。さらに追加免疫として、25  $\mu$ g の rhST2 をフロインド不完全アジュバントに混合したものをマウスの腹腔内に注射した。最後の免疫から 5 日後に、マウスの脾臓細胞を摘出した。摘出した脾臓細胞を無血清 RPMI-1640 培養液中でステンレスメッシュ上ですりつぶした後、脾臓細胞液を遠心分離（1500rpm、7 分間）した。遠心残渣を回収し、無血清 RPMI-1640 培養液に懸濁させた。さらに、無血清 RPMI-1640 培養液で 2 回洗  
20 淨し、抗体産生マウス脾臓細胞を取得した。

尚、免疫が形成されていることを確認するために、マウスの血清を採取してイムノブロッティング法を行った。イムノブロッティング法は、後述の（2-1）の方法と同様に行った。その結果を図 1 のレーン 2 に示す。レーン 1 は、免疫前  
25 のマウスの血清をサンプルとしたコントロールである。レーン 2 において、図中矢印で示される rhST2 タンパクの位置にバンドが観察され、rhST2 を認識する抗

体が産生されていることが確認された。

b. キメラ分子 HMS を発現する COS7 細胞を抗原とした抗体産生細胞の調製

最初に、100  $\mu$ l のフロインド完全アジュバンドのみを Balb/c マウス（6 週令、メス）に皮下注射した。24 時間後に、上記の方法により調製した COS7 抗原 200  $\mu$ l（1 $\times$ 10<sup>6</sup> 個の COS7 細胞を含む）を上記皮下注射をした場所と同じ場所に接種した。追加免疫として、24 時間後に、COS7 抗原 100  $\mu$ l（5 $\times$ 10<sup>5</sup> 個の COS7 細胞を含む）を同様に接種した。最後の免疫から 5 日後に、マウスの脾臓細胞を摘出した。摘出した脾臓細胞を無血清 RPMI1640 培養液中でステンレスメッシュ上ですりつぶした後、脾臓細胞液を遠心分離（1500rpm、7 分間）した。遠心残渣を回収し、無血清 RPMI1640 培養液に懸濁させた。さらに、無血清 RPMI1640 培養液で 2 回洗浄し、抗体産生マウス脾臓細胞を取得した。

尚、免疫が形成されていることを確認するために、マウスの血清を採取してイムノブロッティング法を行った。イムノブロッティング法は、後述の（2-1）の方法と同様に行った。その結果を図 1 のレーン 3 に示す。上記のようにレーン 1 は、免疫前のマウスの血清をサンプルとしたコントロールである。レーン 3 において、図中矢印で示される rhST2 タンパクの位置にバンドが観察され、キメラ分子 HMS を発現する COS7 細胞を抗原とした場合においても、rhST2 を認識する抗体が産生されていることが確認された。

### （1-3） マウスミエローマ細胞の調製

マウスミエローマ細胞には、細胞株 PAI を用いた。マウスミエローマ細胞は、L グルタミン（1mM、フローラボラトリー社 製）、 $\beta$ -メルカプトエタノール（5 $\times$ 10<sup>-6</sup>、ギブコ社 製）、N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸(Hepes)(pH7.2)（10mM、ギブコ社 製）、非必須アミノ酸（0.1mM、ギブコ社 製）及びビルビン酸ナトリウム（1mM、ギブコ社 製）を含む 10%v/v FCS を添加した RPMI1640 完全培地（ウイットカーバイオプロダクツ社 製）で培養した。



(1-4) ハイブリドーマの作製及びクローニング

上記(1-2)のa.又はb.により調製した抗体産生マウス脾臓細胞と上記(1-3)のマウスミエローマ細胞との混合物に、ポリエチレングリコール4000(50%(w/v) in RPMI1640)(メルク社 製)を加えた後、撹拌することにより融合反応を行った。これを96well plateに分注し、HAT 選択培地中で培養した(ハイブリドーマ培養プレート)。

抗 hST2 抗体を産生するハイブリドーマの選択は、hST2 固定化プレートを用いた、マイクロプレート Enzyme-Linked Immunosorbent Assay(ELISA 法: 酵素免疫測定法)により行った。hST2 固定化プレートの作製は以下の方法により行った。まず、96well plate を用意し、この各ウェルに炭酸ナトリウム緩衝液(pH9.0)に2 $\mu$ g/mlの濃度で溶解したヒト ST2 溶液 50 $\mu$ lを加えた。そして、4℃で一晩静置させることにより、hST2 を各ウェル底に吸着させた。各ウェルの溶液を除去した後、非特異的な結合を防止するために、200 $\mu$ lのPBS+0.1%(w/v)BSA を各ウェルに加え、1時間以上静置した。続いて、100 $\mu$ lのPBSにて各ウェルを3回洗浄した。このように準備した hST2 固定化プレートの各ウェルに、上記ハイブリドーマ培養プレートの各ウェルの培養上清を 50 $\mu$ lずつ加え、1時間反応させた。PBS で3回洗浄した後、各ウェルにホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)結合-ヤギ抗マウス IgG 抗体(Bio-Rad 社 製)溶液を加えて、30分反応させた。PBS で4回洗浄した後、50mM 酢酸ナトリウム緩衝液中(pH 5.0)に溶解した 10mM オルト-フェニレンジアミン(OPD)-0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を各ウェルに 100 $\mu$ lずつ加えて20分間反応させた。以上の反応の後、2Nの硫酸を加えて反応を停止し、各ウェルの 492nm における吸光度をマイクロプレートリーダー(日本インターメッド社 製)によって測定した。尚、全ての操作は室温で行なった。

以上のスクリーニングの結果、陽性のウェルは20であった。この20のウェ

ルから、cell ELISA、Western blotting、flow cytometry を用いて、最も反応性の高い 3 ウェルを選択し、各ウェルのハイブリドーマを限界希釈法によりクローニングした。その結果、3 種類のハイブリドーマクローン（2A5：受託番号 FERM P-17781、FB9：受託番号 FERM P-17780、及び  
5 HB12：受託番号 FERM P-17782）を得た。各ハイブリドーマクローンは、以下の国際機関に寄託されている。

#### 国際寄託機関

名称：通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

住所：日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号（郵便番号 305-0046）

10 寄託日：2000 年 3 月 15 日

受託番号：FERM P-17780 (FB9)、FERM P-17781 (2A5)、  
FERM P-17782 (HB12)

ハイブリドーマクローン 2A5 及び FB9 は上記（1-1）a. の rhST2 を抗原として得られたクローンであり、ハイブリドーマクローン HB12 は、上記（1-  
15 1）b. のキメラ分子 HMS を発現する COS7 細胞を抗原として得られたクローンである。

クローニングした各ハイブリドーマは 25・cm<sup>2</sup> カルチャーフラスコ内で 10<sup>6</sup> 個以上に増殖させた。腹水を得る目的で、フラスコから回収した各ハイブリドーマを Balb/c マウス（メス、8~10 週齢）の腹腔に接種した。

20 尚、各ハイブリドーマが産生する抗体についての特性試験は腹水を用いて行った。

#### （1-5）モノクローナル抗体の精製及び標識化

上記各ハイブリドーマより得た腹水を、Hi-Trap protein G カラム（アマシャムファルマシアバイオテク社 製）を用いた親和性カラムクロマトグラフィーに  
25 よって精製し、モノクローナル抗体 2A5、FB9 及び HB12 を得た。

各モノクローナル抗体にビオチン、ホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP)、又はフルオレセインイソチオシアネート(FITC)を結合することにより標識化を行った。ビオチンの結合は ECL タンパク質ビオチン化モジュール (アマシャムファルマシアバイオテク社 製) によって行った。HRP の標識はペルオキシダーゼラベリングキット (ペーリンガーマンハイム社 製) により、製造元のマニュアルに従って行なった。FITC による標識は、2 mg/ml になるように各モノクローナル抗体を 0.1M 炭酸ナトリウム緩衝液(pH9.0)に溶解し、ここへ 15  $\mu$ g/ml の FITC (同仁社 製) を加え、遮光下、4℃で終夜反応させた。反応の停止は、1/10 量の 1.5M ヒドロキシルアミン塩酸(pH8.0)を加えて 30 分間静置する  
5 ことにより行った。結合していない FITC を取り除くため、反応液を Ultrafree  
10 MC3(Millipore 社 製)によって限外ろ過した。

#### [実施例 2] モノクローナル抗体の活性の検討

##### a. イムノブロッティング法

生記で得られたモノクローナル抗体 2A5、FB9 及び HB12 の hST2 に対する活  
15 性を確認するため、イムノブロッティング法を行った。

まず、上記 (1-1) a. においてヘパリンアガロースカラムにより部分的に精製した rhST2 を 10%SDS-PAGE で展開した後、PVDF メンブレンフィルター上に転写した。その後、フィルターを短冊状に切断し、各フィルターを 10 mg/ml のスキムミルクを溶解した 0.05%(v/v)の Tween-20 溶解トリス緩衝生理食塩水  
20 (T-TBS;pH 7.5)中でブロッキングした。続いて、各フィルターに上記 (1-5) で得た精製モノクローナル抗体をスキムミルク/T-TBS 中に溶解したものを反応させた。1 時間の反応後、フィルターをスキムミルク/T-TBS で 3 回洗浄し、スキムミルク/T-TBS に溶解した HRP-結合ヤギ抗マウス IgG と 30 分反応させた。3 回の洗浄の後、ECL システム (アマシャムファルマシアバイオテク社 製)  
25 を用いた化学発光法によりタンパク質のバンドを検出した。尚、すべての反応及

び測定は室温で行なった。

図 1 に検出結果を示す。レーン 4、レーン 5 及びレーン 6 が、それぞれ精製モノクローナル抗体 2A5、FB9、HB12 で処理したサンプルである。各サンプルとも、矢印で示される rhST2 タンパク位置にはっきりとしたバンドが観察され、各

5 抗体が hST2 に高い反応性を示すことが分かる。

#### b. 免疫沈降法

モノクローナル抗体 2A5、FB9 及び HB12 が生体の hST2L を検出できるかどうかを調べるために免疫沈降アッセイを行った。

まず、hST2LcDNA（配列番号 2）を、発現ベクター pEF-BOS に組み込んだ

10 pEF-BOS プラスミドを約  $2 \times 10^7$  の COS7 細胞にトランスフェクトした。その後、トランスフェクトされた COS7 細胞を溶解し、これを 1ml の TNE 緩衝液、10mM Tris-HCl(pH7.8), 1mM EDTA, 0.15M NaCl, 1%(w/v) Nonidet P-40、で抽出した。この抽出液に、protein A 結合 Sepharose4B（アマシャムファルマシアバイオテク社）の 50%(v/v)懸濁液（TNE 緩衝液中）15  $\mu$ l 添加し、4℃で

15 2 時間放置した。遠心処理により得られた上清に、モノクローナル抗体 2A5、FB9 及び HB12 をそれぞれ添加し、各チューブを 4℃で 2 時間回転攪拌した。その後、各チューブに protein A 結合 Sepharose4B の 50%(v/v)懸濁液（TNE 緩衝液中）20  $\mu$ l を添加し、4℃で 2 時間回転攪拌した。遠心の後、ペレットを 5 回 TNE 緩衝液で洗浄した。ペレットを 50  $\mu$ l の 2 倍濃度の SDS サンプル緩衝液に懸濁した

20 後、95℃で 10 分間処理し、続いて遠心処理した。

以上の処理の結果得られた上清(20  $\mu$ l)を SDS-PAGE により展開した。その後、hST2 を認識可能な G7 モノクローナル抗体 (Yoshida K, et al.:Hybridoma 419-427:14,1995)、及び抗マウス IgM-HRP 結合物を用いたイムノブロッティングによって解析した。その結果を図 2 に示した。

25 図 2 において、レーン 2、4 及び 6 は上記のように hST2LcDNA を含む

pEF-BOS でトランスフェクトした COS7 細胞を用い、モノクローナル抗体 2A5 (レーン 2)、FB9 (レーン 4)、HB12 (レーン 6) により免疫沈降したサンプルの結果である。レーン 1、3 及び 5 はそれぞれレーン 2、4、及び 6 のサンプルに対するコントロールであって、hST2LcDNA を含む pEF-BOS の代わりに pEF-BOS 空ベクターを用いて上記と同様の操作を行ったサンプルの結果である。矢印と矢じりはそれぞれ糖鎖を有する (即ち、糖鎖の付加を受けた) 約 80kDa の hST2L 及び糖鎖を有しない (即ち、糖鎖の付加されていない) 約 60kDa の hST2L の位置を示している。図に示されるように、全てのモノクローナル抗体はいずれの hST2L をも免疫沈降する。以上の結果から、モノクローナル抗体 2A5、FB9、及び HB12 はトランスフェクトされた hST2LcDNA の産物を特異的に認識することが示された。また、hST2L の糖鎖の有無は、各抗体との反応に定性的には影響を与えないことが示された。

[実施例 3] モノクローナル抗体の変性していない hST2 との反応性及びエピトープの検討

#### 15 (3-1) cell ELISA 法

モノクローナル抗体 2A5、FB9 及び HB12 が変性していない hST2 を認識できるか否かを、細胞表面に hST2L を発現している生細胞を用いた cell ELISA 法により検討した。

hST2LcDNA を発現ベクター pEF-BOS に組み込んだ pEF-BOS プラスミドを COS7 細胞にトランスフェクトし、トランスフェクトされた細胞を 96well plate で 48 時間培養した。続いて、各ウェルの培地を除去した後、HRP で標識した各モノクローナル抗体を各ウェルに添加した。その際、様々な濃度の rhST2 を併せて添加した。その後、プレートを 37℃、5% CO<sub>2</sub> 下で 15 分間保温した。以上の反応の後、各ウェル中の細胞を温和に PBS で 3 回洗浄し、各ウェルの HRP 酵素活性を測定した。

測定結果のグラフを図 3 に示す。図中 A のグラフが上記操作により得られたサンプルの測定結果である。図中 B のグラフは、hST2LcDNA を含む pEF-BOS プラスミドの代わりに、hST2LcDNA を含まない空の pEF-BOS プラスミドを用いて同様の操作を行ったサンプルの測定結果である。また、白、グレー及び黒の各  
5      バーは、モノクローナル抗体を反応させる際に同時に添加する rhST2 の量をそれぞれ 0  $\mu$ g/ml、10  $\mu$ g/ml、及び 50  $\mu$ g/ml とした場合の測定結果である。尚、各データは平均値 $\pm$ 標準偏差(SD: n=8)で示した。

図 3 A に示されるように、COS7 細胞と HRP-標識抗体との相互作用は、rhST2 の存在によって減少している。これにより、相互作用が特異性であることが分かる。  
10      また、本実験では細胞の固定を行っていないため、トランスフェクトされた COS7 細胞表面に発現された hST2L タンパクは変性されておらず、ネイティブの状態である。このことから、本実験により、各モノクローナル抗体は生細胞表面に発現されている、変性していない hST2L を認識することができるという事が示された。hST2L の細胞外部分は hST2 に相当するため、各モノクローナル抗体  
15      は変性していない hST2 を認識することが示される。

### (3-2) 競合 ELISA 法

モノクローナル抗体 2A5、FB9 及び HB12 が hST2 の同じ部位を認識するか否かを調べるために、以下に示すように競合 ELISA 法を行った。

まず、ビオチン化モノクローナル抗体 2A5、FB9 及び HB12 (各 200ng/ml)  
20      を hST2 タンパクがコートされた 96 ウェルプレートに加えた。その際同時に、様々な濃度の未標識モノクローナル抗体 2A5、FB9 及び HB12 を同時に添加し、1 時間室温で反応させた。プレートを 3 回洗浄し、ストレプトアビジン-HRP 結合物を加えてさらに 30 分反応させた。プレートを洗浄後、各プレートのペルオキシダーゼ活性を測定した。測定結果をグラフにしたものを図 4 に示す。尚、示  
25      したデータは 4 回の独立した実験の平均値である。

図4に示されるように、モノクローナル抗体 2A5 の結合は、それ自身によってのみ競合的に阻害された（パネル A）。即ち、モノクローナル抗体 2A5 は他のモノクローナル抗体と異なる部位を認識して hST2 に結合することが示される。一方、パネル B 及び C より、モノクローナル抗体 FB9 とモノクローナル抗体 HB12 は互いに相手が hST2 に結合することを量依存的に阻害する。即ち、モノクローナル抗体 FB9 とモノクローナル抗体 HB12 は競合的に hST2 に結合することが分かる。

以上の結果より、モノクローナル抗体 FB9 又はモノクローナル抗体 HB12 が認識する hST2 の部位と、モノクローナル抗体 2A5 が認識する hST2 の部位とは異なることが示された。

#### 【実施例 4】モノクローナル抗体の反応性の確認

上記(3-1)により、モノクローナル抗体 2A5、FB9 及び HB12 は COS7 生細胞上の hST2 を認識することが示された。そこで、各モノクローナル抗体をフローサイトメトリに使用可能か否かを検討した。

まず、細胞表面に hST2L を発現させるために、hST2LcDNA を含む pEF-BOS プラスミドを COS7 細胞にトランスフェクトさせた。トランスフェクトされた COS7 細胞をトリプシンの非存在下において培養皿からはがした後、PBS に懸濁した。ここへ、モノクローナル抗体 2A5、FB9、及び HB12 をそれぞれ加え、室温で 15 分間反応させた。PBS による 3 回の洗浄の後、2 次抗体としてウサギ抗マウス Ig-FITC 標識（DAKO 社 製）を加えて、室温で 15 分間処理し、再び PBS で 3 回洗浄した。その後、細胞を  $2 \mu\text{g/ml}$  のプロピジウムイオダイドを含む PBS で再懸濁し、FACScan（Becton-Dickinson 社 製）を用いたフローサイトメトリで分析した。尚、ST2LcDNA を含む pEF-BOS プラスミドの代わりに空の pEF-BOS プラスミドを用いて COS7 細胞をトランスフェクトしたサンプルをコントロールとした。各サンプルの測定結果を図 5 の A に示した。

図 5 の A において、上から順にモノクローナル抗体 2A5、FB9、及び HB12 を用いたサンプルの分析結果のグラフである。各グラフにおいて塗りつぶした範囲が hST2L cDNA を含む pEF-BOS を COS7 細胞にトランスフェクトしたサンプルの測定結果であり、塗りつぶさない範囲が空の pEF-BOS を COS7 細胞にトランスフェクトしたサンプルの測定結果である。図 5 の A に示されるように、各モノクローナル抗体を用いたサンプルにおいて、hST2L cDNA を含む pEF-BOS をトランスフェクトした COS7 細胞の内のいくらかは右にシフトした（図 5 の A の矢印に示した部分）。

次に、生体内で実際に hST2L を発現している細胞をフローサイトメトリーで分析できるか否かを検討するため、hST2L がネイティブの状態が発現していることが確認されているヒト白血病細胞株 UT-7/GM 細胞（Tominaga S, et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 14:18:264,1999, Komatsu N, et al.: Blood, 40:21-40:33:89,1997, Yoshida K, et al.: Hybridoma, 41:9-42:7:14,1995）を用いて、上記と同様の実験を行った。トランスフェクトされた COS7 細胞に代えてヒト白血病細胞株 UT-7/GM 細胞を用いた。尚、コントロールとして、モノクローナル抗体 2A5、FB9、又は HB12 の代わりに IgG を用いたサンプルを用意した。フローサイトメトリーによる各サンプルの分析結果を図 5 の B に示す。

図 5 の B において、上から順にモノクローナル抗体 2A5、FB9、HB12 及びコントロール IgG を用いたサンプルの分析結果のグラフである。各グラフにおいて塗りつぶした範囲が FITC 標識抗体 2A5、FB9、HB12、及びコントロール IgG で処理したサンプルの測定結果であり、塗りつぶさない範囲がそれらの抗体で処理を行わなかったサンプルの測定結果である。図より、コントロール IgG がわずかな非特異的結合が認められるが、モノクローナル抗体 2A5 で処理された細胞は明らかにグラフ上で右に移動し特異的な抗原を検出したことが示される。また、



モノクローナル抗体 FB9 又は HB12 で処理された細胞も、モノクローナル抗体 2A5 に比較して程度が小さいものの確実に右にシフトしている。この様に、生体内において hST2 を発現している細胞をフローサイトメトリーで分析するために、各モノクローナル抗体を用い得ることが示された。

## 5 【実施例 5】 抗 hST2 ポリクローナル抗体の作製及び標識化

### (5-1) 免疫及び抗血清の採取

実施例 1 で得た rhST2 を用いて、ウサギ（日本白色メス 3.5kg）に対し皮下免疫を行い（約 10 箇所、1 回/週）、5 回免疫後に耳下静脈より少量の採血を行い、血清を分離し ELISA 法により抗体価をチェックした。即ち、1/100M 生理的  
10 リン酸緩衝食塩液 (PBS) に rhST2 を溶解して 0.1mg/ml の溶液を調製し、この溶液をヌンク社製 96 穴マイクロプレート「マキシソープ」の各ウェルに 100  $\mu$  l ずつ添加し、室温（20 $\sim$ 25 $^{\circ}$ C）で 3 時間放置した。その後、各ウェルの溶液を吸引除去した。続いて、5% のウシ血清アルブミンを含む PBS を 30  $\mu$  l 加え、4 $^{\circ}$ C で約 18 時間静置することにより各ウェルの未反応部分をブロッキングした。ブ  
15 ロッキング液を除いた後、各ウェルを 300  $\mu$  l の PBS で 3 回洗浄した。この様に準備したプレート各ウェルへ、上記血清を PBS で倍数希釈することにより抗血清の系列を作製したものを 100  $\mu$  l ずつ加えて室温（20 $\sim$ 25 $^{\circ}$ C）で 1 時間静置した。各ウェルより反応液を除いた後、30  $\mu$  l の PBS で各ウェルを 4 回洗浄した。  
次に、希釈したペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG（（株）医学生物学研究所 製）  
20 100  $\mu$  l を加え室温（20 $\sim$ 25 $^{\circ}$ C）で 1 時間静置反応させた。続いて、上記と同様に各ウェルを PBS で洗浄した後、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジンと過酸化水素の溶液 100  $\mu$  l を発色基質として加えて一定時間反応させた。1.5M リン酸を各ウェルに添加して発色反応を停止し、各ウェルの波長 450nm における吸光度を測定した。十分な抗体価が得られたことを確認後、ウサギの耳下静脈より 70ml の  
25 採血を行い、その結果、約 30ml の抗血清を得た。

### (5-2) 標識化抗体の作製

上記抗血清より、DEAE セルロースカラムを用いて IgG 分画を精製した。この精製 IgG 分画に、IgG 1mg あたり 0.056U の割合でフィシンを添加し、37℃で8時間反応させ、続いて、Ultrogel ACA44 を用いてゲルろ過することにより、  
5 F(ab)'<sub>2</sub> 分画を得た。この F(ab)'<sub>2</sub> 分画にマレイミド法によりペルオキシダーゼを標識し、ペルオキシダーゼ標識化抗体とした。尚、標識方法は医学書院刊、石川栄治著「酵素免疫測定法 第3版」に従って行った。

### 【実施例6】 検体中の hST2 を定量する ELISA キットの構築

#### (6-1) 抗体の選択

10 まず、高感度の測定が可能なサンドイッチ ELISA キットを構築するため、ST2 の異なる部位を認識する2種類の抗体を選択した。即ち、上記実施例3の(3-2)で示されたように、モノクローナル抗体 2A5 は、モノクローナル抗体 FB9  
又は HB12 が認識する部位とは異なる ST2 の部位を認識するため、モノクローナル抗体 2A5 と FB9 の組み合わせ、又はモノクローナル抗体 2A5 と HB12 との組  
15 み合わせを選択した。この2つの組み合わせを用いて種々のアッセイを行ったところ、2A5 と FB9 の組み合わせを用いた場合の方がバックグラウンドの吸光度が低いことを見出した。更なる検討の結果、モノクローナル抗体 FB9 をプレート上の捕捉用として用い、モノクローナル抗体 2A5 を検出用として用いる場合に最も  
バックグラウンドの吸光度が低くなることを見出した。それ故、モノクローナル  
20 抗体 2A5 と FB9 の組み合わせを選択し、最終的にモノクローナル抗体 FB9 をプレート上の捕捉用抗体として用い、ビオチン標識化したモノクローナル抗体 2A5 を検出用の抗体として用いることとした。

#### (6-2) モノクローナル抗体固相化マイクロプレートの作製

0.1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(pH9.5)に溶解したモノクローナル抗体 FB9 溶液 100μl (3μg の抗体を含む) をヌンク社製 96 穴マイクロプレート「マキシソープ」の各ウエ  
25

ルに 10  $\mu$ l ずつ加え、4℃で 20 時間静置反応させた。その後、抗体溶液を除去し、0.1%(w/v)BSA を含む PBS を各ウェル 200  $\mu$ l ずつ加え、室温 (20~25℃) で 2 時間静置してブロッキングを行った。ブロッキング液を除去した後、プレートを 0.05%(w/v)の Tween20 を含む PBS200  $\mu$ l で 3 回洗浄した。その後、プレートを 5 風乾してモノクローナル抗体 FB9 固相化マイクロプレートを得た。この固相化抗体は乾燥剤と共に密封して保存した。

【実施例 7】 サンドイッチ ELISA 法による検体中の可溶性 ST2 量の測定

被検血清を 0.1%(w/v)BSA を含む PBS で 10 倍希釈し、上記 (6-2) のマイクロプレートの各ウェルに 100  $\mu$ l ずつ添加した。スタンダードとしては、同じ 10 バッファーで希釈して任意の濃度に調製した rhST2 を用意し、検体と同様に 100  $\mu$ l を添加した。尚、rhST2 の濃度は BSA を標準としてブラッドフォード法を用いて測定した。

このように調製したマイクロプレートを室温 (20~25℃) で 2 時間緩やかに振盪しながら反応させた後、各ウェルのサンプルを除去し、続いて、0.1% Tween20 を含む PBS を各ウェルに 30  $\mu$ l 添加及び除去することにより各ウェルを洗浄した。この洗浄操作は 5 回行った。洗浄液を除去した後、0.1%(w/v)BSA を含む PBS に溶解されたビオチン標識化モノクローナル抗体 2A5(400ng/ml)を 50  $\mu$ l 添加し、室温で 2 時間反応させた。各ウェルを上記と同様に 3 回洗浄した後、ストレプトアビジン-HRP 結合物を各ウェルに添加して、30 分間反応させた。最後に、0.1% Tween20 を含む PBS で 4 回洗浄の後、50mM 酢酸ナトリウム緩衝液中(pH 5.0)に溶解した 10mM オルト・フェニレンジアミン(OPD)・0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を各ウェルに 100  $\mu$ l ずつ加えて 20 分間反応させた。以上の反応の後、各ウェルの 450nm における吸光度をマイクロプレートリーダー(日本インターメッド社 製)によって測定した。

25 図 6 に示されるグラフは、標準物質としての rhST2 を用いて作製したスタンダ

ードカーブである。このスタンダードカーブと、検体の吸光度より各検体中の可溶性 hST2 量を定量した。

この測定系を用いて、健常者 99 例 (healthy control)、アトピー性喘息患者 10 例 (atopic asthma)、肺癌患者 38 例 (lung cancer) を測定した。各サンプルは 2 重に測定した。測定結果を図 7 に示す。図 7 において、左から順に、アトピー性喘息患者のサンプル、肺癌患者のサンプル、健常者のサンプルの測定結果をプロットしてある。各グループのグラフにおいて、95%の信頼度の範囲を四角で囲って示した。同様にバーで示した範囲は 90%の信頼度の範囲を示している。90%の信頼度の範囲外のサンプルの測定値は白抜きの丸で示した。

図 8 には、各疾患又は健常者の例数、平均値、標準偏差及び標準誤差を示した。図 7 及び図 8 に示される結果より、血中の可溶性 ST2 量がアトピー性喘息において優位に高値であることが示された。即ち、本発明の測定方法によれば、迅速かつ簡便にアトピー性喘息の診断が可能であることが示された。

本発明は、上記発明の実施の形態及び実施例の説明に何ら限定されるものではない。特許請求の範囲の記載を逸脱せず、当業者が容易に想到できる範囲で種々の変形態様もこの発明に含まれる。

#### 産業上の利用の可能性

本発明によれば、変性していない可溶性 hST2 又は膜結合型 hST2L の検出、測定等に有用な抗ヒト ST2 モノクローナル抗体が提供される。また、抗ヒト ST2 モノクローナル抗体を用いた可溶性ヒト ST2 の簡便かつ迅速な測定方法が提供される。かかる測定方法はヒト ST2 の機能解明に有効な手段となる。また、免疫系の異常を原因とするアレルギー疾患や自己免疫疾患などの診断ないし治療に関する有効な手段が提供されることとなる。特に、アトピー性喘息の診断に有効な手段が提供される。

## 請 求 の 範 囲

1. 変性していないヒト ST2 に特異的に結合するモノクローナル抗体。
2. 前記モノクローナル抗体は、受託番号が F E R M P - 1 7 7 8 0、F E R M P - 1 7 7 8 1、又は F E R M P - 1 7 7 8 2 であるハイブリドーマによ
- 5 り產生される、ことを特徴とする請求の範囲第 1 項に記載のモノクローナル抗体。
3. 請求の範囲第 1 項に記載のモノクローナル抗体を產生するハイブリドーマ。
4. 受託番号が F E R M P - 1 7 7 8 0、F E R M P - 1 7 7 8 1、又は F E R M P - 1 7 7 8 2 であるハイブリドーマ。
5. 請求の範囲第 1 項又は第 2 項に記載のモノクローナル抗体を用いて検体中の
- 10 可溶性ヒト ST2 を免疫学的に測定する、ことを特徴とする可溶性ヒト ST2 の測定方法。
6. 下記 a) ~ c) のステップを含む、可溶性ヒト ST2 の免疫学的測定方法。
  - a) 変性していないヒト ST2 に特異的に結合する第 1 の抗ヒト ST2 抗体を不溶性支持体に結合させた固相化抗体と、検体と、を反応させるステップ、
  - 15 b) 前記 a) のステップにより生じた第 1 の反応生成物と、前記第 1 の抗ヒト ST2 抗体が結合する ST2 の部位と異なる部位を認識して変性していないヒト ST2 に特異的に結合する第 2 の抗ヒト ST2 抗体であって、標識物質により標識された第 2 の抗ヒト ST2 抗体と、を反応させることにより該第 1 の反応生成物を標識化するステップ、
  - 20 c) 標識化された前記第 1 の反応生成物の標識量を測定するステップ。
7. 下記 d) ~ g) のステップをさらに含む、ことを特徴とする請求の範囲第 6 項に記載の可溶性ヒト ST2 の免疫学的測定方法。
  - d) 前記固相化抗体と、標準物質としての可溶性ヒト ST2 と、を反応させるステップ、
  - 25 e) 前記 d) のステップにより生じた第 2 の反応生成物と、前記標識物質によ

り標識された第2の抗ヒト ST2 抗体と、を反応させることにより該第2の反応生成物を標識化するステップ、

f) 標識化された前記第2の反応生成物の標識量を測定する、ことにより検量線を作成するステップ、

- 5      g) 前記第1の反応生成物の標識量と前記検量線とから前記検体中の可溶性ヒト ST2 を定量するステップ。

8. 前記第1の抗ヒト ST2 抗体又は前記第2の抗ヒト ST2 抗体は変性していないヒト ST2 に特異的に結合するモノクローナル抗体である、ことを特徴とする請求の範囲第6項又は第7項に記載の可溶性ヒト ST2 の免疫学的測定方法。

- 10    9. 前記第1の抗ヒト ST2 抗体又は前記第2のヒト ST2 抗体は、受託番号が F E R M P-17780、F E R M P-17781、及び F E R M P-17782 のハイブリドーマの群から任意に選択される1又は2種以上のハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体である、ことを特徴とする請求の範囲第6項又は第7項に記載の可溶性ヒト ST2 の免疫学的測定方法。

- 15    10. 前記第1の抗ヒト ST2 抗体及び前記第2の抗ヒト ST2 抗体は、それぞれ変性していないヒト ST2 に特異的に結合するモノクローナル抗体である、ことを特徴とする請求の範囲第6項又は第7項に記載の可溶性ヒト ST2 の免疫学的測定方法。

11. 前記第1の抗ヒト ST2 抗体は、受託番号が F E R M P-17780、F  
20 E R M P-17781、及び F E R M P-17782 のハイブリドーマの群から任意に選択される1又は2種のハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体であり、かつ

前記第2の抗ヒト ST2 抗体は、前記ハイブリドーマの群において選択されなかった1又は2種のハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体である、

- 25    ことを特徴とする請求の範囲第6項又は第7項に記載の可溶性ヒト ST2 の免疫学

的測定方法。

12. 前記第1の抗ヒトST2抗体は、受託番号がFERM P-17780、又はFERM P-17782のハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体であり、かつ

5 前記第2の抗ヒトST2抗体は、受託番号がFERM p-17781により産生されるモノクローナル抗体である、ことを特徴とする請求の範囲第6項又は第7項に記載の可溶性ヒトST2の免疫学的測定方法。

13. 前記標準物質としての可溶性ヒトST2は、リコンビナントヒトST2である、ことを特徴とする請求の範囲第7項～第12項のいずれかの項に記載の可溶性ヒトST2の免疫学的測定方法。

14. 変性していないヒトST2に特異的に結合するモノクローナル抗体を含む可溶性ヒトST2の免疫学的測定用キット。

15. 前記モノクローナル抗体は、受託番号がFERM P-17780、FERM P-17781及びFERM P-17782のハイブリドーマの群から任意に選択される1又は2以上のハイブリドーマにより産生される1又は2以上のモノクローナル抗体である、ことを特徴とする請求の範囲第14項に記載の免疫学的測定用キット。

16. 変性していないヒトST2に特異的に結合する第1の抗ヒトST2抗体と、  
前記第1の抗ヒトST2が結合する部位と異なる部位を認識して変性していない  
20 ST2に特異的に結合する第2の抗ヒトST2抗体であって、標識物質により標識された第2の抗ヒトST2抗体と、及び

標準物質としての可溶性ヒトST2と、を含む可溶性ヒトST2の免疫学的測定用キット。

17. 変性していないヒトST2に特異的に結合する第1の抗ヒトST2抗体を不溶性支持体に結合してなる固相化抗体と、  
25

前記第 1 の抗ヒト ST2 が結合する部位と異なる部位を認識して変性していない ST2 に特異的に結合する第 2 の抗ヒト ST2 抗体であって、標識物質により標識された第 2 の抗ヒト ST2 抗体と、及び

標準物質としての可溶性ヒト ST2 と、を含む可溶性ヒト ST2 の免疫学的測定用  
5   キット。

18. 前記第 1 の抗ヒト ST2 抗体又は前記第 2 の抗ヒト ST2 抗体は変性していないヒト ST2 に特異的に結合するモノクローナル抗体である、ことを特徴とする請求の範囲第 16 項又は第 17 項に記載の可溶性ヒト ST2 の免疫学的測定用キット。

19. 前記第 1 の抗ヒト ST2 抗体又は前記第 2 のヒト ST2 抗体は、受託番号が F  
10   ERM   P-17780、FERM   P-17781、及び FERM   P-17  
782 のハイブリドーマの群から任意に選択される 1 又は 2 種以上のハイブリド  
ーマにより産生されるモノクローナル抗体である、ことを特徴とする請求の範囲  
第 16 項又は第 17 項に記載の可溶性ヒト ST2 の免疫学的測定用キット。

20. 前記第 1 の抗ヒト ST2 抗体及び前記第 2 の抗ヒト ST2 抗体は、それぞれ変  
15   性していないヒト ST2 に特異的に結合するモノクローナル抗体である、ことを特  
徴とする請求の範囲第 16 項又は第 17 項に記載の可溶性ヒト ST2 の免疫学的測  
定用キット。

21. 前記第 1 の抗ヒト ST2 抗体は、受託番号が FERM   P-17780、F  
ERM   P-17781、及び FERM   P-17782 のハイブリドーマの群  
20   から任意に選択される 1 又は 2 種のハイブリドーマにより産生されるモノクロー  
ナル抗体であり、かつ

前記第 2 の抗ヒト ST2 抗体は、前記ハイブリドーマの群において選択されなかつ  
た 1 又は 2 種のハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体である、  
ことを特徴とする請求の範囲第 16 項又は第 17 項に記載の可溶性ヒト ST2 の免  
25   疫学的測定用キット。



22. 前記第1の抗ヒトST2抗体は、受託番号がFERM P-17780又はFERM P-17782のハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体であり、かつ

前記第2の抗ヒトST2抗体は、受託番号がFERM P-17781のハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体である、ことを特徴とする請求の範囲第16項又は第17項に記載の可溶性ヒトST2の免疫学的測定用キット。

23. 前記標準物質としての可溶性ヒトST2は、リコンビナントヒトST2である、ことを特徴とする請求の範囲第16項～第22項のいずれかの項に記載の可溶性ヒトST2の免疫学的測定用キット。

24. 受託番号がFERM P-17780であるハイブリドーマにより産生されるヒトST2に特異的に結合する第1のモノクローナル抗体を不溶性支持体に結合してなる固相化抗体に検体を反応させた後、受託番号がFERM P-17781であるハイブリドーマにより産生される、第2のモノクローナル抗体を標識物質で標識してなる標識化抗体を反応させ、生じた第1の反応生成物の標識量を測定するステップと、

前記固相化抗体にリコンビナントヒトST2を反応させた後、前記標識化抗体を反応させ、生じた第2の反応生成物の標識量を測定する、ことにより検量線を作成するステップと、及び

前記第1の反応生成物の標識量と前記検量線とから前記検体中に含まれる可溶性ヒトST2を定量するステップと、を含む可溶性ヒトST2の免疫学的測定方法。

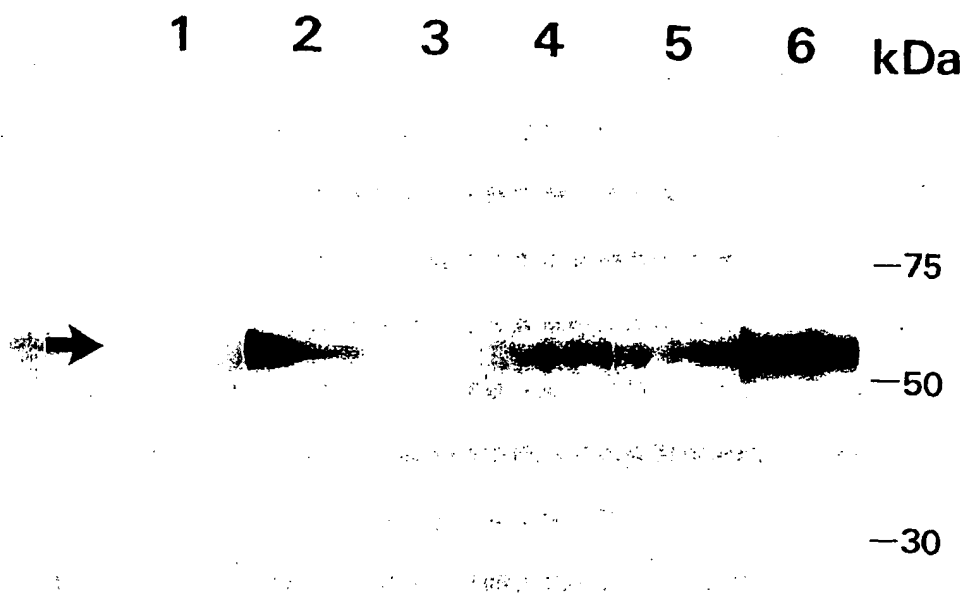
25. 受託番号がFERM P-17780であるハイブリドーマにより産生される、ヒトST2に特異的に結合する第1のモノクローナル抗体を不溶性支持体に結合してなる固相化抗体と、

受託番号がFERM P-17781であるハイブリドーマにより産生される第2のモノクローナル抗体を標識物質で標識してなる標識化抗体と、及び

標準物質としてのリコンビナントヒト ST2 と、を含む可溶性ヒト ST2 の免疫学的測定用キット。

1/8

Fig. 1



2/8

Fig. 2

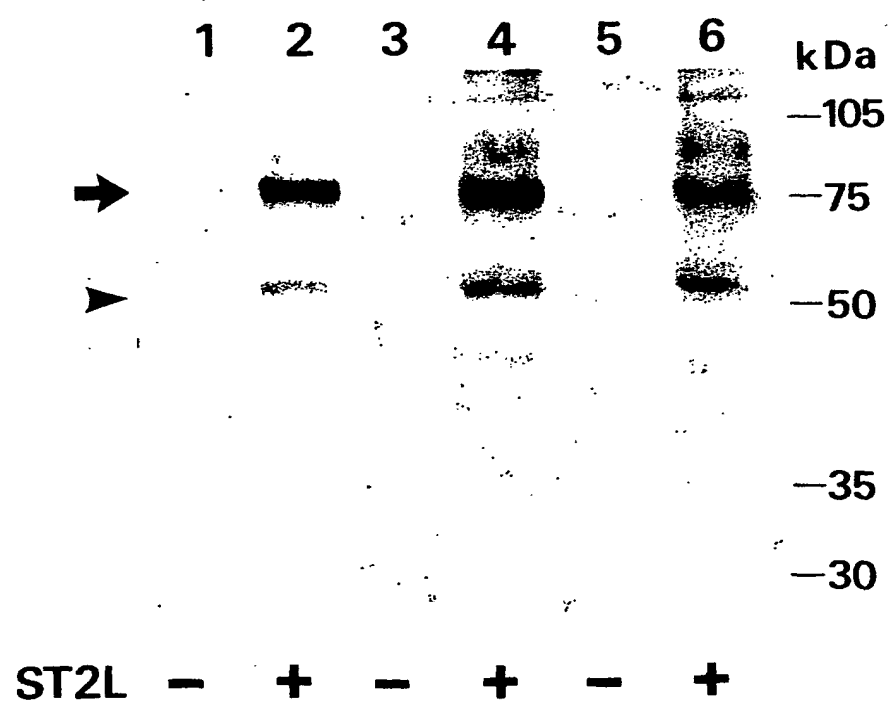


Fig. 3

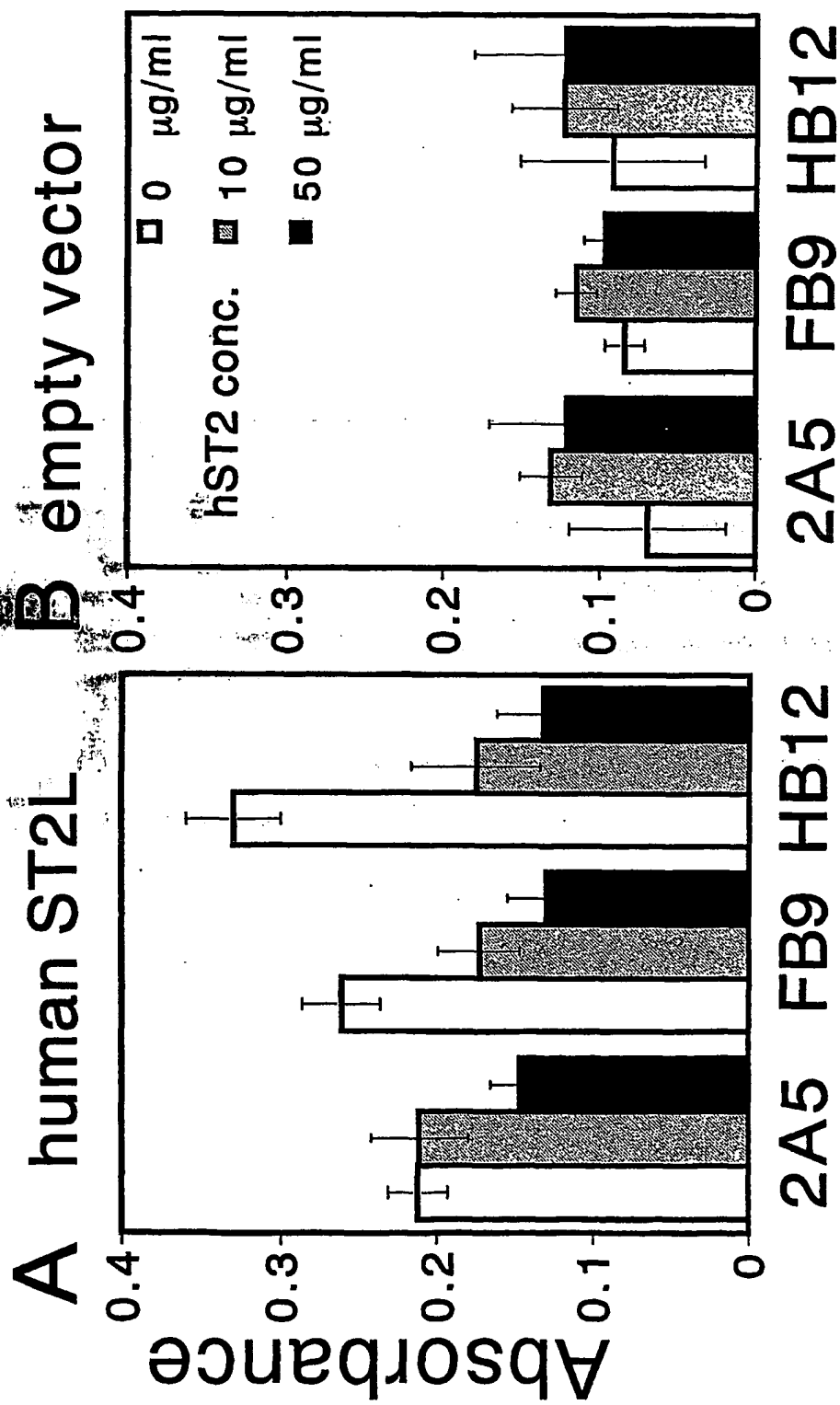


Fig. 4

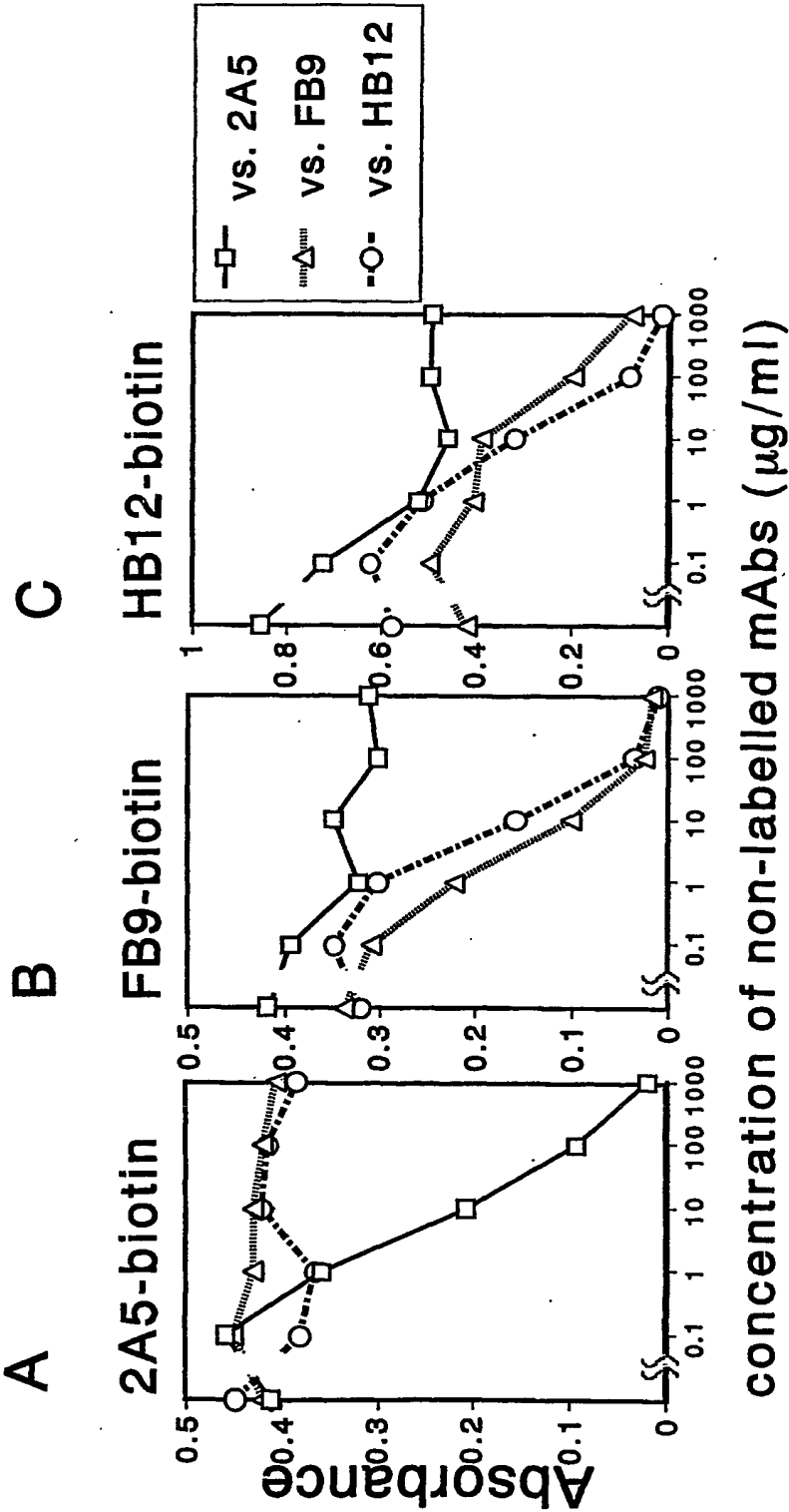


Fig. 5

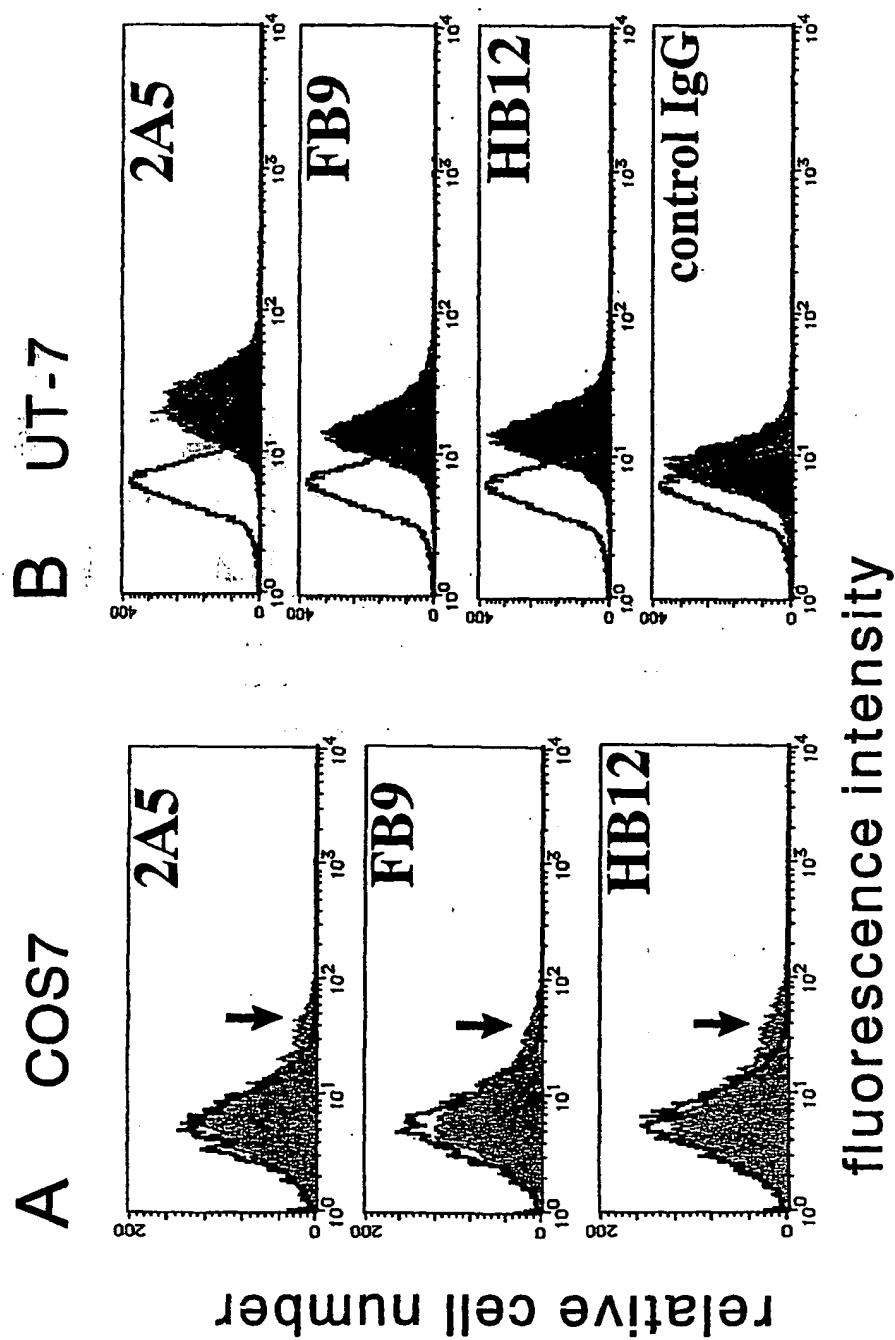
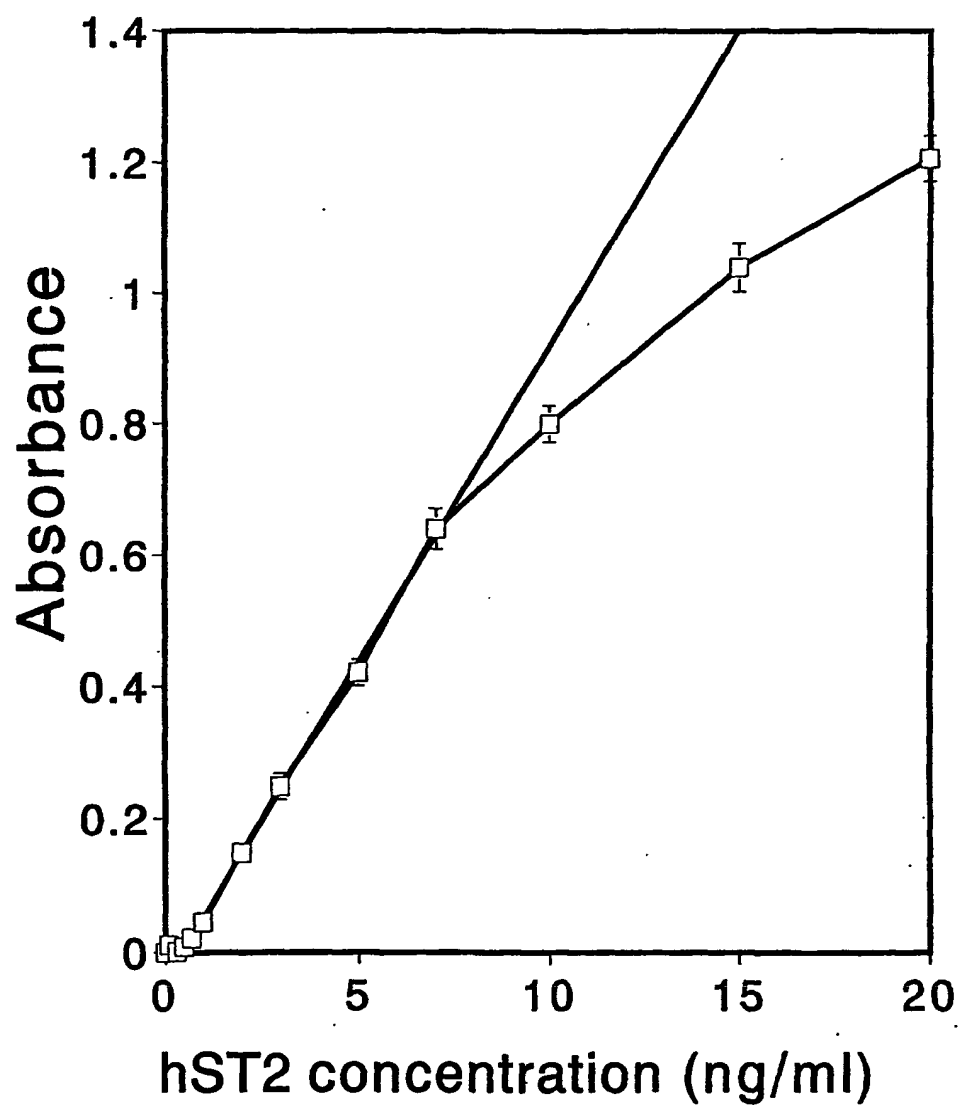


Fig. 6





7/8

Fig. 7

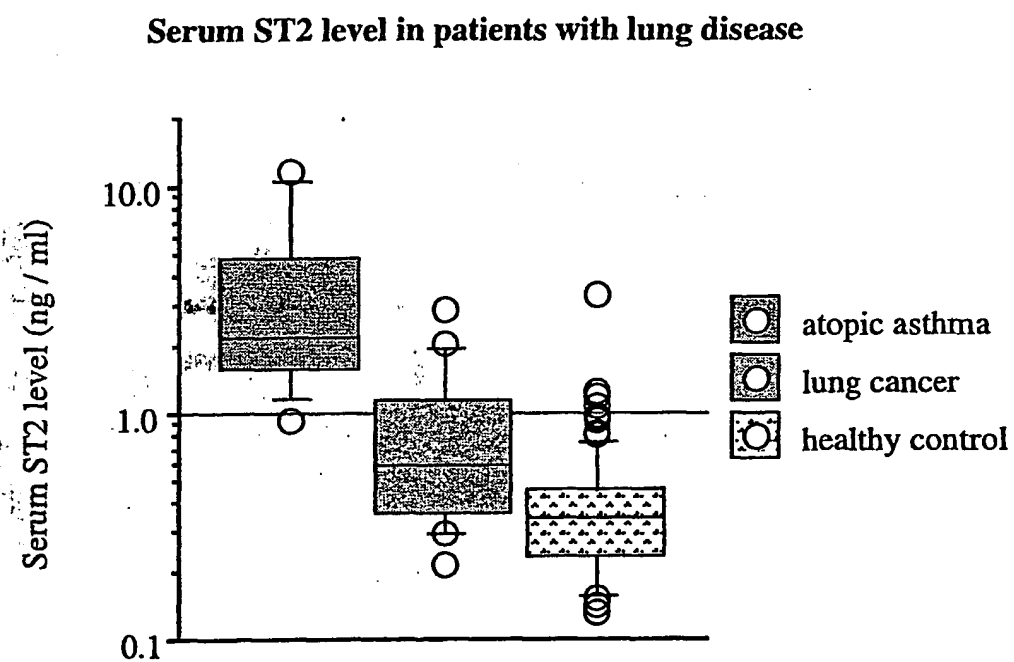


Fig. 8

基本統計量 : ST2

	例数	平均値	標準偏差	標準誤差
atopic asthma	10	3.963	3.697	1.169
lung cancer	38	0.806	0.643	0.104
control	99	0.416	0.385	0.039

1/4

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; MEDICAL &amp; BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD.

Tominaga, Shin-ichi

Arai, Takao

<120> Monoclonal antibody against human ST2 and immunological  
method and kit for measuring human ST2 by using said  
antibody

&lt;130&gt; P019201

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;150&gt; JP P2000-77383

&lt;151&gt; 2000-03-21

&lt;160&gt; 2

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1357

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;300&gt;

&lt;301&gt; Tominaga, S.

Yokota, T.

Yanagisawa, K.

Tsukamoto, T.

Takagi, T.

Tetsuka, T.

<302> Nucleotide sequence of a complementary DNA for human  
ST2

2/4

&lt;303&gt; Biochim. Biophys. Acta

&lt;304&gt; 1171

&lt;305&gt; 1992

&lt;306&gt; 215-218

&lt;308&gt; DDBJ/D12763

&lt;400&gt; 1

atctcaacaa cgagttacca atacttgctc ttgattgata aacagaatgg ggTTTTGGAT 60  
cttagcaatt ctcaaatc tcatgtattc cacagcagca aagtttagta aacaatcatg 120  
gggcctggaa aatgaggcct taattgiaag atgtcctaga caaggaaaac ctagttacac 180  
cgtggattgg tattactcac aaacaacaa aagtattccc actcaggaaa gaaatcgtgt 240  
gtttgccica ggccaacttc tgaagtttct accagctgaa gtgctgatt ctggtattta 300  
tacctgtatt gtcagaagtc ccacattcaa taggactgga tatcggaatg tcacatata 360  
taaaaaacaa tcagattgca atgttcaga ttatttgatg tattcaacag tatctggatc 420  
agaaaaaat tccaaaattt attgtcctac cattgacctc tacaactgga cagcacctct 480  
tgagtggttt aagaattgtc aggctcttca aggatcaagg tacaggggcg acaagtcatt 540  
tttggctcatt gataatgtga tgactgagga cgcaggtgat tacacctgta aatttatata 600  
caatgaaaat ggagccaatt atagtgtgac ggcgaccagg tccttcacgg tcaaggaiga 660  
gcaaggcttt tctctgtttc cagtaatcgg agcccctgca caaatgaaa taaaggaagt 720  
ggaaattgga aaaaacgcaa acctaacttg ctctgcttgt ttggaaaag gcactcagtt 780  
cttggctgcc gtcctgtggc agcttaattg acaaaaaatt acagactttg gtgaaccaag 840  
aattcaacaa gaggaagggc aaaatcaaag ttccagcaat gggctggcct gtctagacat 900  
ggttttaaga atagctgacg tgaaggaaga ggatttatg ctgcagtacg actgtctggc 960  
cctgaatttg catggcttga gaaggcacac cgtaagacta agtaggaaaa atccaagtaa 1020  
ggagtgtttc tgagactttg atcacctgaa ctttctctag caagtgaag cagaatggag 1080  
tgtggttcca agagatccat caagacaatg ggaatggcct gtgccataaa atgtgcttct 1140  
cttcttcggg atgttgtttg ctgtctgac ttgttagact gtccctgttt gctgggagct 1200  
tctctgctgc ttaaattgtt cgtcctcccc cactccctcc tatcgttggg ttgtctagaa 1260  
cactcagctg cttctttggg catccttgtt ttctaacttt atgaactccc tctgtgtcac 1320  
tgtatgtgaa aggaaatgca ccaacaaccg aaaactg 1357

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 2058

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

3/4

&lt;300&gt;

&lt;308&gt; DDBJ/AB012701

&lt;400&gt; 2

aaagagaggc tggctgttgt atttagtaaa gctataaagc tgtaagagaa attggccttc 60  
tgagtgtga aactgtgggc agaaagtga ggaagaaaga actcaagtac aacccaatga 120  
ggttgagata taggctactc ttcccaactc agtcctgaag agtatcacca actgcctcat 180  
gtgtgggtgac cttcactgtc gtatgccagt gactcatctg gagtaatctc aacaacgagt 240  
taccaatact tgctcttgat tgataaacag aatgggggtt tggatcttag caattctcac 300  
aattctcatg tattccacag cagcaaagtt tagtaaaca tcatggggcc tggaaaatga 360  
ggctttaatt gtaagatgtc ctagacaagg aaaacctagt tacaccgtgg attggtatta 420  
ctcacaaca aacaaaagta ttcccaactc ggaagaaat cgtgtgttg cctcaggcca 480  
actctgaag tttctaccag ctgaagtgtc tgattctggt atttatacct gtattgtcag 540  
aagtcacaca ttcaatagga ctggatatgc gaatgtcacc atatataaaa aacaatcaga 600  
ttgcaatggt ccagattatt tgaatgtatt aacagtatct ggatcagaaa aaaattccaa 660  
aatttattgt cctaccattg acctctacaa ctggacagca cctcttgagt ggtttaagaa 720  
ttgtcaggct cttcaaggat caaggtagag ggcgacacag tcatttttgg tcattgataa 780  
tgatgatgact gaggacgcag gtgattacac ctgtaaatt atacacaatg aaaatggagc 840  
caattatagtg tgaaggcga ccaggctcct cacggtaag gatgagcaag gcttttctct 900  
gtttccagta atcgagagcc ctgcacaaaa tgaaataaag gaagtggaaa ttggaaaaaa 960  
cgcaaaccta acttgcctctg cttgttttgg aaaaggcact cagttcttgg ctgccgtcct 1020  
gtggcagctt aatggaacaa aaattacaga ctttgggtgaa ccaagaattc aacaagagga 1080  
agggcaaat caaagttca gcaatgggct ggcttgtcta gacatggttt taagaatagc 1140  
tgacgtgaag gaagaggatt tattgtctga gtacgactgt ctggccctga atttgcattg 1200  
cttgagaagg cacaccgtaa gactaagtag gaaaaatcca attgatcatc atagcatcta 1260  
ctgcataatt gcagtatgta gtgtattttt aatgctaata aatgtcctgg ttatcatcct 1320  
aaaaatgttc tggattgagg ccactctgct ctggagagac atagctaaac cttacaagac 1380  
taggaatgat ggaagctct atgatgctta tgttgtctac ccacggaact acaaatccag 1440  
tacagatggg gccagtcgtg tagagcactt tttcaccag attctgcctg atgttcttga 1500  
aaataaatgt ggctatacct tatgcattta tgggagagat atgctacctg gagaagatgt 1560  
agtcactgca gtggaaacca acatagaaa gagcaggcgg cacattttca tcttgacccc 1620  
tcagatcact cacaataagg agtttgccta cgagcaggag gttgccctgc actgtgccct 1680  
catccagaac gacgccaagg tgatacttat tgagatggag gctctgagcg agctggacat 1740  
gctgcaggct gaggcgcttc aggactccct ccagcatctt atgaaagtac aggggacat 1800  
caagtggagg gaggaccaca ttccaataa aaggctcctg aattccaaat tctggaagca 1860

4/4

cgtaggtac caaatgcctg tgccaagcaa aattcccaga aaggcctcta gttigactcc 1920  
cttggctgcc cagaagcaat agtgcctgct gtgatgtgca aagggatctg ggtttgaagc 1980  
tttcctgact tctcctagct ggcttatgcc cctgcactga agtgtgagga gcgggaatat 2040  
taaagggaat caggccac 2058

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/08723

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C07K16/28, C12N5/16, C12Q1/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C07K16/28, C12N5/16, C12Q1/06

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS, CAS ONLINE, DDBJ/EMBL/GenBank/Geneseq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO, 98/43090, A1 (WERENSKIOLD), 01 October, 1998 (01.10.98) & EP, 970378, A	1-25
A	Yanagisawa, K et al., "The expression of ST2 gene in helper T*cells and the binding of ST2 protein to myeloma- derived RPMI8226 cells." J.Biochemistry, Vol. 121 (1997) pp.95-103	1-25

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not  
considered to be of particular relevance"E" earlier document but published on or after the international filing  
date"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is  
cited to establish the publication date of another citation or other  
special reason (as specified)"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other  
means"P" document published prior to the international filing date but later  
than the priority date claimed"T" later document published after the international filing date or  
priority date and not in conflict with the application but cited to  
understand the principle or theory underlying the invention"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
considered novel or cannot be considered to involve an inventive  
step when the document is taken alone"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
considered to involve an inventive step when the document is  
combined with one or more other such documents, such  
combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
06 March, 2001 (06.03.01)Date of mailing of the international search report  
24 April, 2001 (24.04.01)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl <sup>7</sup> C07K16/28, C12N5/16, C12Q1/06		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl <sup>7</sup> C07K16/28, C12N5/16, C12Q1/06		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS, CAS ONLINE, DDBJ/EMBL/GenBank/Geneseq		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO, 98/43090, A1 (WERENSKIOLD). 01.10月.1998(01.10.98) & EP, 970378, A	1-25
A	Yanagisawa, K et al. "The expression of ST2 gene in helper T cells and the binding of ST2 protein to myeloma-derived RPMI 8226 cells." J. Biochemistry, 第121巻 (1997) p. 95-103	1-25
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 06.03.01		国際調査報告の発送日 24.04.01
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 加藤 浩 電話番号 03-3581-1101 内線 3448



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☒ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**